

10/598377

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. September 2005 (09.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/083054 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 1/06. (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/002065
- (22) Internationales Anmeldedatum:
26. Februar 2005 (26.02.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 010 828.5
27. Februar 2004 (27.02.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): INSILICO BIOTECHNOLOGY GMBH [DE/DE]; Allmandring 31, 70569 Stuttgart (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): DAUNER, Michael [DE/DE]; Oper 9, 72147 Nehren (DE). SCHAUB, Jochen [DE/DE]; Schliffkopfstrasse 28, 70569 Stuttgart (DE).
- (74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Gleiss Grosse Schrell & Partner, Leitzstrasse 45, 70469 Stuttgart (DE).
- (84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2005/083054 A1

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR THERMAL CONDITIONING OF A CELL.

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND MITTEL ZUM THERMISCHEN KONDITIONIEREN EINER ZELLE

(57) Abstract: The invention relates to methods and agents for thermal conditioning of a biological cell, methods and uses of said agents for releasing and insulating ingredients outside the biological cell and for quantitatively and qualitatively detecting the released ingredient and to a method for sampling biological cells which consists in carrying out in one step the sampling said biological cells in a culture medium and in releasing cellular ingredients during said sampling. Sampling devices are also disclosed.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle, Verfahren und Verwendungen dieser Mittel zur Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus der biologischen Zelle und dem quantitativen und qualitativen Nachweis der freigesetzten Inhaltsstoffe sowie ein Probennahmeverfahren, welches in einem einzigen Schritt die Überführung einer Probe biologischer Zellen aus einem Kulturmedium und die Freisetzung der Zellinhaltsstoffe bei der Überführung vorsieht, und Vorrichtungen zur Durchführung der Probennahme.

Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer Zelle

Beschreibung:

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle sowie Verfahren und Verwendungen dieser Mittel zur Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus der biologischen Zelle und zum quantitativen und qualitativen Nachweis der freigesetzten Inhaltsstoffe.

Weiter betrifft die vorliegende Erfindung ein Probennahmeverfahren, welches in einem einzigen Schritt die Überführung einer Probe biologischer Zellen aus einem Kulturmedium und die Freisetzung der Zellinhaltsstoffe bei der Überführung vorsieht, sowie Vorrichtungen zur Durchführung der Probennahme.

Vitale biologische Zellen erhalten unter physiologischen Wachstumsbedingungen ihre Zellstruktur aufrecht. Aufgrund der cytoplasmatischen Membran beziehungsweise Membranen weiterer Zellkompartimente werden aus vitalen biologischen Zellen nur Stoffwechselendprodukte oder Botenstoffe, in der Regel nicht aber hauptanteilig die in der Zelle enthaltenden Inhaltsstoffe, insbesondere Metabolite, in die Zellumgebung abgeben. Metabolit ist jede im biologischen Stoffwechsel auftretende, im Wesentlichen niedermolekulare Substanz. Sie ist zu unterscheiden von den so genannten Biopolymeren wie Proteinen, DNA-Molekülen, mRNA-Molekülen und anderen, wobei deren Vorstufen, Abbau-, Spalt- und Bildungsprodukte jedoch wiederum den Metaboliten zuzurechnen sind.

Um Zellinhaltsstoffe und insbesondere Metabolite aus biologischen Zellen zu gewinnen, werden im Stand der Technik einige Verfahren seit langem unverändert angewandt, die jedoch gravierende Nachteile aufweisen.

Bei etablierten Verfahren wird in der Regel die zelluläre Integrität zerstört. Hierunter fallen beispielsweise die Metabolit-Freisetzung mittels Ultraschall, mechanische Zellaufschlussverfahren (z.B. Rührwerkskugelmühle) oder auch der lange bekannte Einsatz von kochendem Wasser oder von überkritischen Lösungen, zum Beispiel im Autoklaven. Biologischen Zellen setzen bekanntermaßen durch lange Erhitzung in kochendem Wasser Makromoleküle wie Plasmid-DNA in die Kulturlösung frei (Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (1994) Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.; Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, 2. ed., Cold Spring Harbor).

Andere bekannte Methoden zur Metabolit-Freisetzung, beispielsweise der Einsatz von chemischen Lösungsmitteln, Säuren, Laugen und unpolaren Lösungsmitteln, modifizieren die Zusammensetzung der Proben-Suspension derart, dass anschließend ausgewählte Detektionsmethoden, wie die Bestimmung der Metabolit-Konzentrationen durch enzymatische Assays, nicht mehr eingesetzt werden können. Oder aber werden durch die chemischen Lösungsmittel Fällungsreaktionen beziehungsweise chemische Reaktionen der Metabolite angeregt, die zu einer Verfälschung von Mess- und Analyseergebnisse führen. Wünschenswert sind daher Zellaufschlussverfahren, bei deren Anwendung die freigesetzten Inhaltsstoffe; insbesondere die Metabolite, im Wesentlichen unverändert erhalten werden können. Weitere bekannte Aufschluss- beziehungsweise Lyseverfahren sind die Einwirkung chemischer Reagenzien sowie Gefrier-Tau-Zyklen.

Bei diesen Vorgehensweisen werden die biologischen Zellen thermisch, chemisch und/oder mechanisch belastet und verlieren ihre zelluläre strukturelle

Integrität beziehungsweise Zellstruktur, das heißt sie lysieren. Die Zellwand und die Cytoplasmamembran werden dabei zerstört und die Inhaltsstoffe werden freigesetzt. Dabei bilden sich auch Zelltrümmer in Form von beispielsweise Mikrocellen, nackter DNA und Proteinkomplexen.

Nach derartigem Vorgehen liegen nach der Zelllyse nachteilhafterweise in der Zellsuspension neben den interessierenden freigesetzten Inhaltsstoffen auch Zelltrümmer, nackte DNA und Proteinkomplexe vor. Die Gegenwart dieser Komponenten ist beim Nachweis und der Analyse der Inhaltstoffe, insbesondere der Metabolite, meist störend. Daher sind der Zelllyse nachfolgende Reinigungsschritte wie insbesondere chromatographische und/oder elektrophoretische Auftrennungen erforderlich, um die Inhaltsstoffe, insbesondere die Metabolite, in zweckmäßiger Reinheit zu erhalten. Dies ist insbesondere für die weitere Verarbeitung beziehungsweise zum Nachweis oder Analyse erforderlich, um beispielsweise eine spezifische Analyse der Metabolite mittels chromatographischer, enzymatischer beziehungsweise massenspektroskopischer Methoden zu ermöglichen. Ein verbessertes Verfahren zur Gewinnung von Inhaltsstoffen, insbesondere von Metaboliten, aus biologischen Zellen, welches insbesondere einfach durchzuführen und die Kontamination der freigesetzten Inhaltsstoffe mit störenden Komponenten wie Zelltrümmer, nackte DNA und Proteinkomplexe minimiert ist, ist daher wünschenswert.

Weiter sind Probennahmeverfahren, insbesondere zum Überführen von Proben biologischer Zellen aus Kultivierungsgefäßen, beispielsweise einem Bioreaktor, in ein Probengefäß bekannt. Solche Probennahmeverfahren dienen in erster Linie zur Erforschung physiologischer Parameter biologischer Zellen und zur Analyse der Prozessführung in der Biotechnologie und der Bioverfahrenstechnik. Folgende Parameter sind dabei erstrebenswert: (1) eine möglichst schnelle Überführung von Zellsuspension aus einem Zellkultivierungssystem in ein Probennahmegeräß, um gegebenenfalls eine hohe Probennahmfrequenz zu ermöglichen ("Transfer"); (2) die prompte Abstopfung des Metabolismus, damit die interessierenden Metabolite nicht durch enzymatische Reaktionen

weiter umgesetzt werden ("Quenching"); (3) die möglichst vollständige Freisetzung der Metabolite aus den Zellen durch Anwendung verschiedener Aufschlussverfahren ("Aufschluss"); (4) die in der Probenlösung enthaltenen Metabolite müssen von Zelltrümmern und nicht lysierten Zellen getrennt werden ("Abtrennung"); optional müssen (5) für eine quantitative Biologie weitere Randbedingungen wie die Berücksichtigung der Stabilität von Metaboliten in den durchlaufenen Schritten sowie deren Freisetzungsgrade beziehungsweise deren Adsorptionsverhalten an Komponenten der Zellsuspension und Hilfsmaterialien eingehalten werden ("Quantifizierbarkeit").

Ein schnelles Probennahmeverfahren wurde von Theobald und Mitarbeitern (*In vivo analysis of glucose-induced fast changes in yeast adenine nucleotide pool applying a rapid sampling technique. Anal Biochem. (1993) 214:31-7*) entwickelt. Diese Probennahme besteht aus einer dünnen Edelstahlkapillare (Innendurchmesser 0,7 mm) und einem Kugelhahn. Konstruktive Maßgabe war die Minimierung des Totvolumens (200 µl), da die Probennahme durch diskretes Öffnen/Schließen des Hahns erfolgt. Bei einem Gesamtvolumen von ca. 5 ml je Probe ist das Totvolumen vernachlässigbar klein. Diese Probennahme integriert weder Schritte zum Abstoppen des Metabolismus noch zur Metaboliextraktion. Auch sind diskrete Öffnungs-/Schließvorgänge des Kugelhahns ohne jede Automatisierung vorgesehen. Die Zellsuspension wird durch vakuumierte Proberöhrchen gefördert (Vakumpumpe, 8×10^{-3} mbar), die Probennahmfrequenz beträgt, da manuell, nur ca. $0,2 \text{ s}^{-1}$.

Eine Weiterentwicklung ist die von Lange und Mitarbeitern (*Improved rapid sampling for in vivo kinetics of intracellular metabolites in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. (2001) 75:406-15.*) verwendete Probennahme. Eine Reduzierung des effektiven Totraumvolumens auf 50 µl pro Probennahme wird durch den Einbau einer Bypassleitung und Ansteuerung je eines Ventils für die Probennahme- bzw. die Bypassleitung erreicht. Durch schnelle Ventilumschaltung zwischen diesen beiden Leitungen kann so verhindert werden, dass Probe aus dem Totraum gezogen wird. Außerdem wird der Verlust an

Probe minimiert. Die geometrischen Abmessungen (Innendurchmesser der Kapillare: 1,0 mm, Länge: 80 mm) sind vergleichbar der Probennahme von Theobald. Die Förderung der Zellsuspension erfolgt ebenfalls diskret durch ein Vakuum in den versiegelten Reagenzgläsern (Vakuumpumpe). Die Probennahmfrequenz ist ebenfalls niedrig und beträgt ca. $1,5 \text{ s}^{-1}$ allein für die Fluidförderung. Dieser Wert für die Probennahmfrequenz berücksichtigt allerdings nicht die Zeit für die Ausbildung des Vakuums (ca. 1 s) sowie die für den manuellen Wechsel der einzelnen Reagenzgläser benötigte Zeit.

In den bekannten Probennahmeverrichtungen findet sowohl das Abstoppen des Metabolismus als auch die Metabolitextraktion in konstruktionstechnisch getrennten Einheiten statt, und damit zeitlich getrennt und nicht integriert während der Probennahme und durch das Probennahmesystem selbst. Dabei sind Quenching und Metabolitfreisetzung teilweise getrennte Prozessschritte, teilweise aber auch durch chemische Einwirkungen einer zweiten Phase (z. B. Säuren, Basen, flüssigen Stickstoff, tiefgekühltes Methanol) in einem Schritt zusammengefasste Operationen.

Aus der DE 4407439 A1 ist ein „Verfahren und Vorrichtung zur Serienprobennahme biologischer Proben“ bekannt, worin halb-kontinuierlich eine Probe in eine Polypropylen-Rohrwendel (Innendurchmesser: 8 mm, Länge: 100 m, Wendeldurchmesser: 0,5 m) gezogen wird bis diese mit Zellsuspension und parallel zudosierter Perchlorsäure (35% w/v, bei -25°C) gefüllt ist. Durch die Perchlorsäure erfolgt eine sofortige Inaktivierung des Metabolismus bei gleichzeitiger Zerstörung der Zellstruktur und Freisetzung der Metabolite. Wenn die Rohrwendel gefüllt ist, wird diese bei -80°C gefroren. Diese kann dann in Stücke zerteilt aufgetaut werden, wobei sich die Lage eines Probesegments im Schlauch zum Beispiel mit einem bestimmten Zeitpunkt der Änderung der Kultivierungsbedingung, wie der dynamischen Anregung (z.B. pulsartige Erhöhung der Glucosekonzentration in glucoselimitierter Kultur), korrelieren lässt.

Eine kontinuierliche Probennahme wird in der DE 19705289 A1 beschrieben. Die Probennahme erfolgt kontinuierlich, ein gleichzeitiges Quenchen sowie die Freisetzung von Metaboliten dadurch ist aber nicht vorgesehen.

Somit sind die wesentlichen Grundanforderungen an jedes Quenching-, Aufschluss- und Abtrennungsverfahren (i.) ein möglichst schnelles Abstoppen des Metabolismus, das heißt vollständige, irreversible Inaktivierung/ Denaturierung der Enzyme beziehungsweise deren sofortige Abtrennung, (ii.) eine reproduzierbare, daher in der Regel möglichst vollständige Zerstörung der Zellstruktur bzw. Permeabilisierung der Zellmembran zur vollständigen Freisetzung der Metabolite aus den Zellen, (iii.) eine leichte Abtrennung von Metaboliten, Zellteilen und Zellen. Weiter dürfen (iv.) die zu untersuchenden Metabolite durch die Maßnahmen (i.) bis (iv.) in ihrer strukturellen Integrität (chemischen Struktur) nicht dermaßen beeinflusst werden, dass keine eindeutige Identifikation und Analyse mehr möglich ist. Ferner muss für eine quantitative Analyse in den einzelnen Schritten eine reproduzierbare Freisetzung und eine negative Beeinflussung der Messung durch ein nicht reproduzierbares Adsorptionsverhalten der Metabolite an Hilfsmitteln vermieden werden.

Typischerweise umfassen die Verfahrensschritte Quenching/Aufschluss/Abtrennung Zwei-Phasen-Systeme zum Quenching und Aufschluss, Filtration und Zentrifugation zur Abtrennung. Ein Abstoppen des Metabolismus kann zum einen durch chemische Reagenzien erfolgen, zum anderen durch Anwendung eines Temperaturgradienten.

Nach Theobald et al. (s.o.) wird in versiegelte Reagenzgläser unter Vakuum Perchlorsäure (35% w/v bei -20°C) vorgelegt, nutzt also Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes wässriger Lösungen zum Abstoppen des Metabolismus bei überlagerter Extraktion mittels gekühlter Perchlorsäure. Weiterhin wurden drei Gefrier-Tauzyklen durchgeführt (durch Eiskristallbildung wird die Zellwand dabei permeabilisiert). Vor der Analyse müssen die Proben neutralisiert

werden, wobei der sich bildende KClO_4 -Niederschlag in einem Filtrationsschritt beseitigt wird.

Nach Lange et al. (s.o.) werden ebenfalls Temperaturen unterhalb des Gefrierpunktes wässriger Lösungen eingesetzt, wobei 5 ml Methanol (-40°C) als Quenchingmittel vorgelegt werden. Die Metabolitextraktion erfolgt in dem durch Zentrifugation erhaltenen Zellpellet durch kochendes Ethanol.

Gemäß DE 19705289 A1 wird eine Methanolmischung bei -50°C als Quenchingflüssigkeit mit anschließender Zentrifugation (-20°C), Resuspension des mit Perchlorsäure und einem Gefrier-Tauzyklus (-80°C) zur Metabolitextraktion, Neutralisierung der Lösung und erneuter Zentrifugation zur Entfernung des Niederschlags eingesetzt.

Weiter werden flüssiger Stickstoff in Verbindung mit Gefrier-Tauzyklen zum Quenching beziehungsweise Extrahieren verwendet sowie anstelle von kochendem Ethanol auch kochendes Wasser (Bhattacharya, Fuhrman, Ingram, Nickerson, Conway. Single-run separation and detection of multiple metabolic intermediates by anion-exchange high-performance liquid chromatography and application to cell pool extracts prepared from *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* (1995) 232:98-106).

Weiter sind Vorrichtungen bekannt, die dem Bauprinzip eines Wärmetauschers entsprechen. Sie werden insbesondere als Sterilisationseinheiten zur thermischen Behandlung kleiner Volumenströme eingesetzt. Aus der EP 0722075 A1 ist eine kontinuierlich zu betreibende Sterilisationseinheit für den Labor-/Technikumsmaßstab bekannt. Dabei wird der Gesamtvolumenstrom in mehrere gleichlange Rohre über aufwändig gestaltete Verteilerblenden symmetrisch aufgeteilt. Zur Sterilisation ist die Kurzzeiterhitzung bei ca. 140°C vorgesehen.

Ein dampfbeheizter Wärmeaustauscher ist aus der DE 2345243 A1 bekannt. Charakteristisch ist der optimierte Wärmeübergang durch wendelförmige Strömungsführung und geometrische Veränderung der Strömungsquerschnitte.

Aus der WO 92/16807 ist eine Vorrichtung bekannt, die ebenfalls zur Vergrößerung der Oberfläche und Optimierung der Strömungsverhältnisse Rohrwendeln verwendet und als Besonderheit Flüssigkeitsinjektoren aufweist. Diese sorgen für zusätzliche Verwirbelung und damit einen verbesserten Wärmeübergang.

Die Kurzzeiterhitzung biologischer Proben durch Mikrowellen ist ebenfalls bekannt, beispielsweise aus der EP 0217662 A1. Beschrieben sind sowohl das Verfahren der Sterilisation mittels Mikrowellen, als auch die hierfür erforderliche Vorrichtung.

Keine dieser bekannten Vorrichtungen ist eine Zellkonditioniereinrichtung und wird für die Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen, insbesondere Metabolite, biologischer Zellen eingesetzt.

Ausgehend vom Stand der Technik liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Verfahren für die Konditionierung biologischer Zellen sowie Mittel dazu bereitzustellen, die im Wesentlichen die verbesserte Freisetzung und Isolierung von Inhaltsstoffen aus der biologischen Zelle und insbesondere einen verbesserten quantitativen und qualitativen Nachweis der freigesetzten Inhaltsstoffe ermöglicht.

Das technische Problem wird gelöst durch die Bereitstellung eines Verfahrens zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle, wobei die Zelle bei einer Kultivierungstemperatur T_M in einem Kulturmedium kultiviert wird und anschließend für eine Konditionierzeit t_h bei einer Konditioniertemperatur T_K konditioniert wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass dabei das aus der Kultivierungstemperatur T_M , Konditioniertemperatur T_K und Konditionierzeit t_h gemäß der Formel

$$WE = t_h \cdot (T_K - T_M)$$

errechnete Wärmeäquivalent WE , Werte von $70 \text{ K} \cdot \text{s}$ bis $300 \text{ K} \cdot \text{s}$ annimmt.

Das heißt, die Parameter Kultivierungstemperatur T_M , Konditionierungszeit T_K und Konditionierzeit t_h werden gemäß der Erfindung stets so gewählt, dass das errechnete Wärmeäquivalent WE von $70 \text{ K} \cdot \text{s}$ bis $300 \text{ K} \cdot \text{s}$ beträgt.

Eine wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Wärmebehandlung von Zellen zur vollständigen Freisetzung von Metaboliten ohne die Zerstörung der strukturellen Integrität der Zellen. Strukturelle Integrität der Zelle bedeutet die Beibehaltung der Hülle der Zelle in einem Stück und keine Bildung von Bruchstücken daraus. Damit findet auch keine signifikante Bildung von Zellfragmenten statt (subzelluläre Partikel wie Micellen aus der Cytoplasma-membran, nackte DNA-Bruchstücke, mRNA, Proteinkomplexe). Durch das einfache Durchlichtmikroskop bei einer 500fachen Gesamtvergrößerung (Okular x Tubus x Objektiv = $10 \times 1.25 \times 40$) betrachtet, sind beispielsweise vollständig intakte *E. coli*-Zellen und *E. coli*-Zellen mit struktureller Integrität in ihrer Größe nicht unterscheidbar.

Die Erfinder fanden überraschend, dass durch die erfindungsgemäße thermische Konditionierung in einem durch das Wärmeäquivalent WE vorgegebenen engen Temperaturbereich und dem genau darauf abgestimmten Zeitintervall die Freisetzung der zellulären Inhaltsstoffe, insbesondere der Metabolite, erreicht wird, wobei gleichzeitig, besonders vorteilhaft, die Zellstruktur der thermisch konditionierten biologischen Zelle erhalten bleibt. Im Wesentlichen liegen nach dem erfindungsgemäßen thermischen Konditionieren neben den freigesetzten Inhaltsstoffen, insbesondere den Metaboliten, „entleerte“ Zellhüllen mit intakter Struktur vor: Das Auftreten von Zelltrümmern und weiteren störenden Komponenten ist vermindert und wird bei zweckmäßiger Wahl der Parameter und je nach Anwendungsgebiet sogar ganz verhindert. Besonders vorteilhaft ist eine einfache und effiziente Abtrennung dieser Zellhüllen mit intakter Struktur von den Metaboliten mittels einfacher Filtration und/oder Zentrifugation möglich. Dadurch wiederum wird, besonders vorteilhaft, eine sich insbesondere unmittelbar an die Konditionierung anschließende quantitative und/oder qual-

tative Analyse der intrazellulären Metabolite, ohne weitere aufwändige Zwischenstufen, ermöglicht.

Anwendungsgebiete der erfindungsgemäßen technischen Lehre sind insbesondere Verfahren und Vorrichtungen zur Bestimmung intrazellulärer Metabolitkonzentrationen in verschiedenen Zellsystemen wie Mikroorganismen, Pilzen oder Zellkulturen tierischer, menschlicher, pflanzlicher Zellen bei Züchtung in Kultivierungssystemen wie Bioreaktor, Schüttelkolben, Proberöhrchen oder Rotiterplatten.

Untersucht werden können gemäß der Erfindung sowohl stationäre als auch nicht stationäre physiologische Zustände der biologischen Zelle(n). Der Metabolismus kann dabei schnellstmöglich abgestoppt werden. Die selektive Metabolitfreisetzung durch die erfindungsgemäß thermisch konditionierten Zellen ermöglicht die einfache Probenaufarbeitung und Aufreinigung für die Analyse.

So wird beispielsweise bei der Durchführung enzymatischer Assays und der Bestimmung der Lichtstreuung und -absorption im Photometer die bei bekannten Freisetzungsverfahren durch das Ausfallen bestimmter Zelltrümmer und anderer störender Komponenten im Medium unvermeidliche Trübung der Probenlösung, wie sie bei der vollständigen Zerstörung der Zellstruktur und der subsequenten Abtrennung durch Filtration beobachtet wird, vermieden. Bei chromatographischen Methoden, beispielsweise bei der HPLC-Analyse, wird die Blockade der HPLC-Säule durch große Zelltrümmer vermieden.

In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt die Konditioniertemperatur T_K von 65°C bis 105°C, bevorzugt von 80°C bis 95°C. Insbesondere werden die vorteilhaften Effekte bei einem Temperaturbereich von 80°C bis 95°C erreicht, jedoch wird auch bei davon abweichenden Werten der Konditioniertemperatur nach oben oder nach unten, je nach Zweck der Anwendung und Anwendungsgebiet ein vorteilhafter Effekt erreicht. Die im Einzelfall einzusetzende Konditioniertemperatur wird der Fachmann aufgrund

seines Fachwissens leicht finden können. In einer bevorzugten Variante liegt die Konditioniertemperatur T_K stets unter dem Siedepunkt des Kulturmediums. Gemäß der Erfindung wird bevorzugt - und im Gegensatz zum Stand der Technik - ein Sieden des die biologischen Zellen enthaltenden Kulturmediums stets vermieden.

In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt die Konditionierzeit t_h von 0,5 s bis 600 s, bevorzugt von 1 s bis 180 s. Auch hier werden die vorteilhaften Effekte insbesondere bei einer Konditionierzeit t_h von 0,5 s bis 600 s erreicht. Jedoch wird auch bei davon abweichenden Werten der Konditionierzeit nach oben oder nach unten, je nach Zweck der Anwendung und Anwendungsgebiet eine vorteilhafte Effekt erreicht. Die im Einzelfall einzusetzende Konditionierzeit wird der Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht finden können.

In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens beträgt die Kultivierungstemperatur T_M von 26°C bis 42°C, bevorzugt von 30°C bis 38°C. Die im Einzelfall einzusetzende Kultivierungstemperatur T_M der biologischen Zellen wird der Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht finden können.

In einer besonders bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens nimmt das aus den Parametern Kultivierungstemperatur T_M , Konditioniertemperatur T_K und Konditionierzeit t_h gemäß der Erfindung errechnete Wärmeäquivalent WE Werte von 90 K· s bis 150 K· s an.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches zur thermischen Konditionierung eines gram-negativen Prokaryonten als biologische Zelle eingesetzt wird, wobei das für diesen Organismus optimale Wärmeäquivalent WE 110 ± 20 K· s beträgt. Ein Beispiel für den gram-negativen Prokaryonten ist das Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*).

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches zur thermischen Konditionierung eines Eukaryonten als biologische Zelle eingesetzt wird, wobei das für diesen Organismus optimale Wärmeäquivalent $WE = 110 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$ beträgt. Ein Beispiel für den Eukaryonten ist der Pilz *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, welches zur thermischen Konditionierung eines gram-positiven Prokaryonten als biologische Zelle eingesetzt wird, wobei das für diesen Organismus optimale Wärmeäquivalent $WE = 130 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$ beträgt. Ein Beispiel für den gram-positiven Prokaryonten ist das Bakterium *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*).

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei das Kulturmedium ein flüssiges Medium ist und das thermische Konditionieren dadurch erfolgt, dass das die biologische Zelle enthaltende flüssige Medium in einer Kapillare fließt, wobei sich die Zelle für eine Konditionierzeit t_h innerhalb einer auf die Konditioniertemperatur T_K temperierten Kapillarstrecke der Kapillare befindet. So wird erfindungsgemäß bevorzugt das entsprechende zweckmäßige Wärmeäquivalent übertragen und die biologischen Zellen gemäß der Erfindung thermisch konditioniert. In einer bevorzugten Variante beträgt der Volumenstrom in der temperierten Kapillarstrecke von 0,5 ml/s bis 12 ml/s. Besonders bevorzugt beträgt der Volumenstrom von 2,5 ml/s bis 8,0 ml/s.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens, wobei der Schritt der thermischen Konditionierung mit der Überführung des die biologischen Zellen enthaltenden Kulturmediums aus einem Kultivierungsgefäß, insbesondere einem Bioreaktor, in ein Auffanggefäß, insbesondere ein Probensammelgefäß, durchgeführt wird. Dadurch wird vorteilhaft eine schnelle Überführung von beispielsweise Zellsuspension aus einem Zellkultivierungssystem in ein Probennahmegeräß, die prompte Abstopfung des Metabolismus in der Zelle und gleichzeitig die Freisetzung der Metabolite aus den Zellen.

len in einem einzigen Verfahrensschritt der an die Probenüberführung gekoppelten thermischen Konditionierung der biologischen Zellen erreicht. Besonders vorteilhaft wird so gemäß der Erfindung eine sich an diese Probenüberführung unmittelbar anschließende quantitative und/oder qualitative Analyse der freigesetzten oder des speziellen interessierenden Metaboliten sowie deren oder dessen Isolierung und Gewinnung ermöglicht. Insbesondere steht der Metabolit nach der an die Probenüberführung gekoppelten thermischen Konditionierung bereits nach einfacher Filtration oder Zentrifugation in zweckmäßig hoher Reinheit zur Verfügung. Auf aufwändige Reinigungsschritte kann verzichtet werden, so dass sowohl eine zeitnahe kontinuierliche Analyse beziehungsweise Gewinnung der Metabolite, als auch eine hohe Probennahmefrequenz realisiert werden kann. Außerdem kann ein hoher Probendurchsatz in gleich bleibender, von wenigen Faktoren abhängiger Qualität erzielt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Gewinnung sowie die quantitative und qualitative Analyse beziehungsweise den quantitativen und qualitativen Nachweis der in der biologischen Zelle enthaltenen Inhaltsstoffe, insbesondere mindestens eines intrazellulären Metaboliten. Dieses ist vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe der Metaboliten, bestehend aus Aminosäuren, Aminen und deren Derivate, Carboxylsäuren, Alkoholen, Aldehyden, Ketonen, Phosphatestern (ohne die Nukleinsäuren), Nukleinsäuren und verwandten Verbindungen, Zuckern und verwandten Verbindungen, Lipiden, Steroiden, Fettsäuren, Vitaminen, Coenzymen und anorganischen Ionen.

Die mittels der nachstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren gewonnenen, quantitativ bestimmten beziehungsweise qualitativ nachgewiesenen Metabolite sind insbesondere:

Metaboliten-Klasse:

Aminosäuren, Amine und deren Derivate

konkrete Metabolite:

Alanin, Glutamat

| | |
|--|---|
| Carboxylsäuren | Pyruvat, Citrat, Isocitrat, Oxoglutarat, Oxaloacetat, Malat, Fumarat, Succinat, Phosphoglycerat, Phosphoenolpyruvat |
| Alkohole | Ethanol |
| Aldehyde | Glycerinaldehydphosphat |
| Phosphatester (ohne Nukleinsäuren) | ppGpp, NAD, NADP, NADH, NADPH, |
| Nukleinsäuren und verwandte Verbindungen | Adenosinmonophosphat, Guanosintriphosphat, Uridindiphosphat, cAMP |
| Zucker und verwandte Verbindungen | Glucosephosphat, Fructosephosphat, Fructosebisphosphat, Phosphogluconat, Ribose- und Ribulosephosphat, Erythrosephosphat, Sedoheptulosephosphat, Dihydroxyacetophosphat |
| Lipide, Steroide und Fettsäuren | Acetyl-CoA |
| Vitamine und Coenzyme | Riboflavin |
| Anorganische Ionen | Phosphat |

Weitere gemäß der Erfindung aus biologischen Zellen gewinnbare beziehungsweise isolierbare, quantitativ bestimmmbare beziehungsweise qualitativ nachweisbare Metabolite sind: Aminobutanoat, Acetoacetat, Acetoacetyl-CoA, Acetaldehyd, Acetyl-L-carnitin, Acetyl-CoA, Acetate, Acetyladenylat, Acetohydroxybutanoat, S-Acetyldihydrolipoamide, N-Acetylglutamat, N-Acetylglutamatphosphat, N-Acetylglutamatsemialdehyd, O-Acetylhomoserin, 2-Acetylactat, N2-Acetylornithin, Acetylphosphate,

N-Acetylglucosamin, N-Acetylglucosaminphosphat, Acylglycerol, 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphat, 1-Acylglycerophosphocholin, 1-Acyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamin, N-Acetylmannosamin, N-Acetylmannosaminphosphat, 2-Amino-3-carboxymuconatsemialdehyd, N-Acetylneuraminat, N-Acetylneuraminat-9-phosphat, Adenin, Adenosin, Adenylosuccinat, Adenylylsulfat, Adenylosuccinat, Adenosindiphosphat, ADP-Ribose, ADP-Ribosephosphat, 1-(5'-Phosphoribosyl)-5-formamido-4-imidazolecarboxamid, Aicar, Aminoimidazolribotid, Ketoglutarat, Ketovalin, Alanin, Aminoacetoacetat, Aminoaceton, Aminoadipat, Aminoadipatadenylat, Aminoadipatsemialdehyd, Aminobenzoat, Aminolevulinat, Adenosinmonophosphat, 2-Aminomuconat, 2-Aminomuconatsemialdehyd, Arginin, (N-Omega-L-arginino)Succinat, Arogenat, S-Adenosylmethioninamin, Asparagin, Aspartat, Asparagin, Aspartylphosphat, Aspartatsemialdehyd, Adenosintriphosphat, Betain, Betainaldehyd, CMP-N-Acetylneuraminat, cAMP, Carnitin, N-Carbamoyl-L-Aspartat, Carbamoylphosphat, Cardiolipin, Cytidindiphosphat, CDP-Cholin, CDP-Diacylglycerol, CDP-Ethanolamin, Ceramid, cGMP, Cholesterin, Cholesta-7,24-dien-3-betaol, Cholin, Cholinphosphat, Chorismat, 3-Carboxy-1-hydroxypropyl-ThPP, Aconitat, Methylaconitat, Citrat, Citrullin, Cytidinmonophosphat, Coenzym A, Coenzym Q, Kreatin, Phosphokreatin, Crotonoyl-CoA, Cytidintriphosphat, Cystein, Cystathion, Cystin, Cytidin, Deoxyadenosin, Deoxyadenosindiphosphat, Deamino-NAD, Deoxyadenosin-monophosphat, Deoxyadenosintriphosphat; Deoxycytidindiphosphat, Deoxycytidinmonophosphat, Deoxycytidintriphosphat, Cytidin, Demethyllanosterol, 4,4-Dimethyl-5-cholesta-8,14,24-trien-3-betaol, Deoxyguanosindiphosphat, Deoxyguanosinmonophosphat, Deoxyguanosintriphosphat, Deoxyguanosin, Dihydroxyacetonphosphat, Dehydrocholesterin, Dihydrofolat, Dihydrolipoamid, Dihydronoopterin, (S)-Dihydroorotat, Dihydropteroat, Dihydrobiopterin, Amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridin, 2-Amino-7,8-dihydro-4-hydroxy-6-(diphosphooxymethyl)pteridin, 33-Dehydroquina, Dehydrosphinganin, Diacylglycerol, Diacylglycerolphosphat, Dimethylglycin, Deoxyinosin,

Dimethylallyldiphosphat, Dimethylglycin, N-Acetyl-D-glucosaminyl-diphosphodolichol, N,N'-Chitobiosyldiphosphodolichol, Dolichol, Dolichylphosphat, Dolichyldiphosphat, Dehydropantoat, Dephospho-CoA, 2-Deoxy-D-ribosephosphat, 3-Dehydroshikimat, Deoxythymidindiphosphat, Deoxythymidinmonophosphat, Deoxythymidintriphosphat, Deoxyuridindiphosphat, Deoxyuridinmonophosphat, Deoxyuridin, Deoxyuridin-triphosphat, Erythrosephosphat, Ethanolamin, Ethanol, Fructosephosphat, Fructosebisphosphat, FAD, Farnesylidiphosphat, 2-(Formamido)-N1-(5'-phosphoribosyl)acetamidin, 5'-Phosphoribosyl-N-formylglycinamid, Fumarylacetoacetat, Formiminotetrahydrofolat, Formylkynurenin, Fosäure, Formiat, Formaldehyd, Formiminoglutama, Fructose, Formyltetrahydrofolat, Formyltetrahydrofolat, Fumarat, Glucosephosphat, Glycerat-2-phosphat, Glycerat-3-phosphat, Galactose, alpha-DGalactose-1-phosphat, D-Glyceraldehyd, Glyceraldehyd-3-phosphat, 5-Phosphoribosylglycinamid, Guanosindiphosphat, GDP-Dehydrodeoxymannose, GDP- Fucose, GDP-Mannose, Geranyldiphosphat, Gluconolactonphosphat, Glyceraldehyd, Glucosamin, Glucosaminphosphat, Glucose, Glutamin, Glycerol, Glycerophosphocholin, Glycerophosphoethanolamin, Gluconat, Phosphogluconat, Glutamat, Glutamatphosphat, Glutamatsemialdehyd, Glutamyl-L-cystein, Glutathion, Glutaryl-CoA, Glycin, Glycerol, Glycerolphosphat, Glycolaldehyd, Glyceron, Glyoxylat, Glycerat, Guanosinmonophosphat, Guanosintriphosphat, Guanin, Guanosin, Guanidinoacetat, Wasserstoffionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxyanthranilat, Hydroxybutantricarboxyla, Homocitrat, Hydrogencarbonat, Homocystein, Hydroxypyridine, Hydroxyprolin, Hydroxypyruvat, Histidin, Homoisocitrat, Hydroxymethylglutaryl-CoA, Homogentisat, 3-(4-Hydroxyphenyl)pyruvat, Sulfid, Homoserin, O-Phosphohomoserin, 2-(alpha-Hydroxyethyl)thiamindiphosphat, Hypoxanthin, Hydroxybutanoyl-CoA, Hydroxyisobutyryl-CoA, Hydroxyisobutyryl, (2S,3S)-3-Hydroxy-2-methylbutanoyl-CoA, 4-Hydroxyphenylpyruvat, Isoleucin, 4-Imidazolon-5-propanoat, D-erythro-1-(Imidazol-4-yl)glycerol-3-phosphat, Inosinmonophosphat, Indol, Indolglycerolphosphat, Inosin, Isobutyryl-CoA,

Isocitrat, Isopropylmalat, Isopentenyldiphosphat, Kaliumion, Kynurenin, Lactose, Lactat, Lactaldehyd, Lanosterol, Lathosterol, Leucin, Lactoylglutathion, Lipoamid, Linolensäure, Linolsäure, Lysin, Malat, Mallonyl-Co, Mannose, Mannosephosphat, Methenyltetrahydrofolat, Methionin, Methylacetoacetyl-CoA, Methylbutenoyl-CoA, Methylloxopentanoat, Methylacrylyl-CoA, Methylthioadenosin, Methylglyoxal, Methylglutaconyl-CoA, Methyltetrahydrofolat, Methanethiol, Methylmalonatsemialdehyd, Methylentetrahydrofolat, Mevalonat, Phosphomevalonat, Diphosphomevalonat, Inositol, Maleylacetoacetat, Mercaptopyruvat, Methyltetrahydro-pteroylglutamat, Natriumion, NAD, NADH, Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, Ammoniumion, Nicotinat, Nicotinamid, Nicotinamidribonucleotid, Nicotinatribonucleotid, Oxaloacetat, Hydroxidion, Oleinsäure, Oleoyl-CoA, Ornithin, Orotat, Orotidinphosphat, Oxoacidat, Methylloxobutanoat, Oxobutanoat, Oxalosuccinat, Orthophosphat, Phosphoadenylylsulfat, Palmitat, Palmitoyl-CoA, Palmitonat, Pantothenat, Pantoat, Pantethein, Phosphoenolpyruvat, Phosphoethanolamin, Bisphosphoglycerat, Phenylalanin, Phenylpyruvat, Phosphohydroxypyruvat, Pyrophosphat, Phosphopantothenat, Pantetheinphosphat, Phosphopantothenoylcystein, Prephenat, Phosphoribosylglycinamid, Phosphoribosylamin, Prolin, Propanoat, Propanoyl-CoA, Phosphoribose-1-diphosphate, Phosphoserin, Presqualendiphosphat, Phosphatidylcholin, Phosphatidyl-N-dimethylethanolamin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylglycerophosphat, Phosphatidyl-N-methylethanolamin, 1-Phosphatidyl-D-myo-inositol, Phosphatidylserin, Putrescin, Pyrrolincarboxylat, Pyruvat, Pyridoxalphosphat, ppGpp, Quinolinat, 1-(5-Phospho-D-ribosyl)-5-amino-4-imidazolcarboxylat, Ribose, Ribosephosphat, Ribulosephosphat, Methyl-3-oxopropanoyl-CoA, Thioschwefelsäureion, Adenosylhomocysteine, 1-(5'-Phosphoribosyl)-5-amino-4-(N-succinocarboxamid)-imidazol, Adenosylmethionin, Saccharopin, Sorbitol, Sedoheptulose-7-phosphat, Serin, Methyl-3-oxopropanoyl-CoA, Sulfition, Sulfation, Spermidin, Sphingomyelin, Sphinganin, Sphingosin, Squalen,

Squalenepoxid, Stearat, Stearyl-CoA, Succinat, Succinyl-coA, S-succinyl-dihydrolipoamid, Succinylhomoserin, Succinatsemialdehyd, Thiocystein, Tetrahydrofolat, Tetrahydrobiopterin, Thiamindiphosphat, Threonin, Thymidin, Tetrahydropteroylglutamat, Trehalose, Trehalosephosphat, Triacylglycerol, Tryptophan, Tyrosin, UDP-N-acetyl-D-glucosamin, UDP-N-acetyl-D-galactosamin, Ubiquinol, Ubiquinon, Uridindiphosphat, UDP-Galactose, UDP-Glucose, Uridinmonophosphat, Uracil, Harnstoff, Allophanate, Uridin, Urocanat, Uridintriphosphat, Valin, Xanthin, Xanthosin, Xanthosinphosphat, Xylulosephosphat und Zymosterol.

Demgemäß ist weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs, insbesondere mindestens eines Metaboliten, aus einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren mindestens einer biologischen Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der mindestens einen biologischen Zelle nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei beziehungsweise wodurch der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, aus der mindestens einen thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) Isolieren des freigesetzten Inhaltsstoffs, insbesondere des mindestens einen Metaboliten, aus dem Kulturmedium.

Besonders bevorzugt wird Schritt a) des Verfahrens in einem Kulturgefäß, insbesondere in Verbindung mit flüssigem Kulturmedium, beispielsweise in einer Suspensionskultur durchgeführt. Der Fachmann kann im Rahmen der vorliegenden technischen Lehre aber auch jede andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßige Kulturbedingung wählen.

Besonders bevorzugt wird Schritt b) des Verfahrens in Verbindung mit der Probenentnahme und Überführung der Probe in ein Auffanggefäß, insbesondere

einem Probengefäß, durchgeführt, beispielsweise in einer dafür vorgesehenen Probennahmeverrichtung.

Schritt c) des Verfahrens kann mittels bekannter Aufreinigungsverfahren in an sich bekannter Weise durchgeführt werden. Besonders bevorzugt und, gemäß der vorliegenden Erfindung besonders vorteilhaft, auch zweckmäßig und ausreichend sind einfache mechanische Trennverfahren wie die Filtration, zum Beispiel mit einem einfachen Sterilfilter, bevorzugt mit $0,2 \mu\text{m}$ Porengröße, oder die Zentrifugation. Zweckmäßigerweise dienen diese Trennverfahren der Abtrennung der im Kulturmedium vorhandenen (intakten) Zellhüllen der thermisch konditionierten Zellen. Im Permeat beziehungsweise im Zentrifugationsüberstand liegen der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, frei von störenden Komponenten vor. Es versteht sich, dass der Fachmann im Rahmen der vorliegenden technischen Lehre, zusätzlich oder an deren Stelle, auch jedes andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßiges Trenn-, Aufreinigungs- oder Isolierungsverfahren wählen kann.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs, insbesondere mindestens eines Metaboliten, in mindestens einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der mindestens einen biologischen Zelle nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei beziehungsweise wodurch der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, aus der mindestens einen thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) quantitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs, insbesondere des mindestens einen Metaboliten, im Kulturmedium.

Besonders bevorzugt wird Schritt a) des Verfahrens in einem Kulturgefäß, insbesondere in Verbindung mit flüssigem Kulturmedium, beispielsweise in einer Suspensionskultur durchgeführt. Der Fachmann kann im Rahmen der vorliegenden technischen Lehre aber auch jede andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßige Kulturbedingung wählen.

Besonders bevorzugt wird Schritt b) des Verfahrens in Verbindung mit der Probenentnahme und Überführung der Probe in ein Auffanggefäß, insbesondere in einem Probengefäß, durchgeführt, beispielsweise in einer dafür vorgesehenen Probennahmeverrichtung.

Schritt c) des Verfahrens wird mittels bekannter quantitativer Nachweisverfahren für den interessierenden Metaboliten in an sich bekannter Weise durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist schließlich auch ein Verfahren zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs, insbesondere mindestens eines Metaboliten, in mindestens einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der mindestens einen biologischen Zelle nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei beziehungsweise wodurch der Inhaltsstoff, insbesondere der mindestens eine Metabolit, aus der mindestens einen thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) qualitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs, insbesondere des mindestens einen Metaboliten, im Kulturmedium.

Besonders bevorzugt wird Schritt a) des Verfahrens in einem Kulturgefäß, insbesondere in Verbindung mit flüssigem Kulturmedium, beispielsweise in einer Suspensionskultur durchgeführt. Der Fachmann kann im Rahmen der vorlie-

genden technischen Lehre aber auch jede andere ihm bekannte und für sein Anwendungsgebiet zweckmäßige Kulturbedingung wählen.

Besonders bevorzugt wird Schritt b) des Verfahrens in Verbindung mit der Probenentnahme und Überführung der Probe in ein Auffanggefäß, insbesondere einem Probengefäß, durchgeführt, beispielsweise in einer dafür vorgesehenen Probennahmeverrichtung.

Schritt c) des Verfahrens wird mittels bekannter qualitativer Nachweisverfahren für den interessierenden Metaboliten in an sich bekannter Weise durchgeführt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zur Probennahme, insbesondere zur Überführung einer Probe biologischer Zellen aus mikrobiellen, vorzugsweise pilzlichen oder bakteriellen, Kulturen oder Mischkulturen sowie Zellkulturen pflanzlicher, tierischer oder menschlicher Zellen. Diese Zellen können in einem Kultivierungssystem wie Bioreaktor, Schüttelkolben, Proberöhrchen oder Microtiterplatten, insbesondere in einem Kulturgefäß in Form einer Suspensionskultur kultiviert werden. Die Erfindung sieht vor, dass die Probe dem Kultivierungssystem entnommen und in mindestens ein Auffanggefäß überführt wird. Dabei findet erfindungsgemäß bevorzugt die thermische Konditionierung der in der Probe enthaltenen biologischen Zelle(n) statt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher eine Zellkonditionierzvorrichtung als Bestandteil einer solchen Probennahmeverrichtung. Die erfindungsgemäße Zellkonditionierzvorrichtung dient dem thermischen Konditionieren mindestens einer biologischen Zelle, welche vorzugsweise in einem flüssigen Kulturmedium suspendiert ist. Die erfindungsgemäße Zellkonditionierzvorrichtung weist mindestens eine an einer Wärmequelle angeordnete und vom flüssigen Kulturmedium durchflossene Kapillare auf, durch die vorzugsweise die im Kulturmedium suspendierte Zellprobe überführt wird. Sie ist erfindungsgemäß dadurch gekennzeichnet, dass die Kapillare einen Innendurchmesser von 0,5 mm bis 4,5 mm, bevorzugt von 1,0 mm bis 3,0 mm, aufweist und entlang einer tem-

perierten Kapillarstrecke von 50 cm bis 1550 cm, bevorzugt von 90 cm bis 420 cm, der Kapillare mit der Wärmequelle in Kontakt steht.

Bevorzugt dient die Zellkonditioniervorrichtung der Durchführung des vorliegend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahrens der thermischen Konditionierung. Wie beschrieben, zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere durch die Einhaltung bestimmter Verfahrensparameter aus, die einen überraschenden vorteilhaften technischen Effekt bewirken.

Zur Durchführung eines Probennahmeverfahrens mit eingeschlossener thermischer Konditionierung wird Zellsuspension aus dem Kultivierungssystem entnommen und mittels eines ersten Abschnitts der Kapillare, der als kurze Überführungsstrecke ausgelegt ist, und eines daran anschließenden zweiten Abschnitts, der als temperierte Kapillarstrecke ausgeführt ist, in ein Probenahmegeräß überführt.

Es wurde überraschend gefunden, dass diese Verfahrensparameter mit der erfindungsgemäßen Zellkonditioniervorrichtung eingehalten werden können, wenn bestimmte geometrische Rahmenbedingungen bei der Dimensionierung der Kapillare der Zellkonditioniervorrichtung eingehalten werden: Dargestellt sind in Tabelle 1 die Abhängigkeit von Rohrwendelinnendurchmesser und Länge der temperierten Kapillare für extreme Volumenströme 2,5 ml/s bzw. 8 ml/s und extreme Turnoverraten intrazellulärer Metabolite, beispielsweise ATP, von $\tau = 0,1$ s bzw. $\tau = 2,7$ s. Die gefundenen Werte lassen sich um beliebige Zwischenwerte für Volumenströme ($2,5 \text{ ml/s} < \dot{V} < 8 \text{ ml/s}$) sowie Turnoverraten ($0,1 \text{ s} < \tau < 2,7 \text{ s}$) erweitern.

Tabelle 1:

| Volumenstrom [ml/s] | Turnover-rate τ [s] | WE [K s] | Rohrwendel- innendurch- messer [cm] | Länge der temperierten Kapillare [cm] |
|------------------------|--------------------------|-------------|---|---|
| 2,5 | 0,1 | 70 | 0,05 | 83 |
| | | 300 | 0,05 | 1502 |
| | 2,7 | 70 | 0,2 | 92 |
| | | 300 | 0,2 | 1511 |
| 8 | 0,1 | 70 | 0,11 | 79 |
| | | 300 | 0,11 | 1498 |
| | 2,7 | 70 | 0,44 | 84 |
| | | 300 | 0,44 | 1503 |

Aufgrund der erfindungsgemäßen Geometrie der Zellkonditionierzvorrichtung beziehungsweise Probennahmeverrichtung kann die optimale Metabolit-Probennahme nur in einem engen Temperaturbereich und einem genau darauf abgestimmten Zeitintervall erfolgen und dadurch die Zellsuspension dermaßen günstig beeinflusst werden, dass der Zellmetabolismus schnell gestoppt und der intrazelluläre Metabolit vollständig freigesetzt wird, die Zellstruktur aber erhalten bleibt. Die Temperatur liegt dabei stets unterhalb des Siedepunkts der Probensuspension.

Ein bevorzugter Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Zellkonditionierzvorrichtung, wobei für ein zu übertragendes Wärmeäquivalent von 70 Ks bis 300 Ks zweckmäßigerweise eine Länge der temperierten Kapillarstrecke von etwa 80 cm bis etwa 1510 cm gewählt wird, wobei

- a) für einen kleinen Volumenstrom von etwa 2,5 ml/s
 - i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 0,5 mm,
 - ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 2 mm und
- b) für einen großen Volumenstrom von etwa 8 ml/s
 - i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 1 mm, insbesondere 1,1 mm,
 - ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 4 mm, insbesondere 4,4 mm

beträgt.

Durch eine entsprechende Abwandlung der Geometrie des erfindungsgemäß vorgesehenen Probennahmesystems wird beispielsweise auch eine Metabolomics-Analyse insbesondere in einem HD-screening-Verfahren möglich.

Ein weiterer bevorzugter Gegenstand ist eine Zellkonditioniervorrichtung, welche als Probennahmevorrichtung zur Entnahme einer Probe aus einer Quelle eines die Zelle enthaltenden flüssigen Kulturmediums ausgebildet ist und zusätzlich eine Probenüberführungsstrecke und eine Probensammelvorrichtung aufweist.

Der Temperaturverlauf der Zellsuspension in der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist schematisch in Figur 2 dargestellt. Folgende Größen dienen der Erläuterung der erfindungsgemäßen Vorrichtung:

$T_{\text{Wärmequelle}}$ = an der Kapillare angelegte Temperatur der Wärmequelle; sie entspricht der Konditioniertemperatur T_K

$T_{\text{Suspension}}$ = Temperatur der Suspension im Kultivierungssystem; sie entspricht der Kultivierungstemperatur T_M

T_Probennahme-

- gefäß = Temperatur der Metabolitlösung im Probennahmegeräß
- s_tot = Strecke vom Eingang in das integrierte Probennahmesystem bis zum Beginn der durch die Wärmequelle temperierten Kapillarstrecke
- s_heiz = Strecke, die für das Aufheizen der Probe vom Eintritt in die durch die Wärmequelle temperierte Kapillare bei T_Suspension bis zum Erreichen der Temperatur T_Wärmequelle durchlaufen wird
- s_halte = Strecke, die die Probe mit der Temperatur T_Wärmequelle in der temperierten Kapillare zurücklegt
- s_Wärmequelle = Länge der durch die Wärmequelle temperierten Kapillarstrecke = Summe von s_heiz und s_halte
- t_tot = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s_tot benötigt
- t_heiz = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s_heiz benötigt
- t_halte = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s_halte benötigt; sie entspricht der Konditionierzeit t_h
- t_Wärmequelle = Zeitdauer, die die Probe für das Zurücklegen von s_Wärmequelle benötigt

Zieht man die Probe bei einer Temperatur der Zellsuspension T_Suspension, vorzugsweise bei Mikroorganismen und Zellkulturen typischerweise 30-37°C, aus dem Kultivierungssystem, so durchläuft diese als erstes eine Überführungsstrecke s_tot und wird beim Eintritt in die temperierte Kapillare auf einer kurzen Strecke s_heiz hinlänglich genau auf die Temperatur der Wärmequelle T_Wärmequelle gebracht, vorzugsweise +/- 5°C, um im Anschluss durch Vermischung mit bereits vorliegender Probelösung im Probennahmegeräß auf

$T_{\text{Probennahmegeräß}}$ gebracht zu werden, vorzugsweise auf 4°C gekühlt. Die Länge der Aufheizstrecke s_{heiz} hängt dabei insbesondere von den Eigenschaften der Zellsuspension, der Geometrie des integrierten Probennahmesystems, der eingestellten Durchflussrate und der angelegten Temperatur $T_{\text{Wärmequelle}}$ durch die Wärmequelle ab. Aufgrund der bevorzugt schnellen Aufheizzeiten wird zur erfindungsgemäßen Übertragung der Wärmeäquivalente die benötigte Zeit der Probe für das Durchlaufen der Aufheizstrecke s_{heiz} , nämlich t_{heiz} , insbesondere der Haltezeit t_{halte} bei einer Temperatur von $T_{\text{Wärmequelle}}$ zugerechnet. Die Zeit t_{halte} bezeichnet die Zeitdauer, die ein infinitesimal kleines Volumenelement mittlerer Strömungsgeschwindigkeit für den Durchlauf der temperierten Kapillarstrecke s_{halte} benötigt.

Eine zur Illustration der Erfindung beispielhaft angeführte Zellkonditioniervorrichtung beziehungsweise Probennahmeverrichtung ist in Figur 1 dargestellt. Diese weist eine Quelle (1), insbesondere einen Bioreaktor, auf, worin ein vorzugsweise flüssiges Kulturmedium (2) mit den darin enthaltenen biologischen Zellen eingefüllt ist. Vorzugweise liegen die Zellen in einer Suspensionskultur in dem Bioreaktor vor. Weiter weist die Vorrichtung mindestens eine Kapillare (3) auf, welche an einer Wärmequelle (4) angeordnet ist. Vorzugsweise steht die Wärmequelle über eine bestimmte Heizstrecke in einer den Wärmefluss zwischen Wärmequelle und dem Lumen der Kapillare fördernden Kopplungsweise mit der Kapillare in Verbindung; diese Heizstrecke entspricht der Länge der temperierten Kapillare.

Demgemäß ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs aus einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das hierin beschriebene Verfahren dazu durchgeführt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung der Zellkonditioniervorrichtung zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer

biologischen Zelle, wobei insbesondere das hierin beschriebene Verfahren dazu durchgeführt wird.

Schließlich ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Verwendung der Zellkonditionierzvorrichtung zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das hierin beschriebene Verfahren dazu durchgeführt wird.

Da im folgenden die Begrifflichkeiten "Ghosts", "Ghost-Faktor", "Trues", "Trümmer", "Trümmer-Faktor" und Gesamzellzahl eine wichtige Rolle spielen werden, sollen hier zunächst deren Definition und Bestimmungsmethoden eingeführt werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter „Ghosts“ Zellen verstanden, deren Cytoplasmamembran irreversibel geschädigt wurde, die aber als vollständige „leere“ Zellhüllen vorliegen. Unter „Trues“ werden Zellen verstanden, deren Cytoplasmamembran intakt ist. „Trümmer“ bezeichnet Bruchstücke einer Zelle, deren zelluläre Integrität zerstört wurde; hierbei handelt es sich insbesondere um Lipid-Mizellen, einzelne Proteine und mRNA, nackte beziehungsweise Protein-gebundene DNA-Bruchstücke und vieles andere mehr. Der Begriff „Ghost-Faktor“ bezeichnet ein quantitatives Äquivalent, woraus die Zahl der Ghosts bestimmt wird. Der Begriff „Trümmer-Faktor“ bezeichnet ein quantitatives Äquivalent, woraus die Zahl der Trümmer bestimmt wird.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Figuren und Beispiele erläutert, die aber nicht beschränkend zu verstehen sind:

Es zeigen

die Figur 1 ein vereinfachtes Schema der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

die Figur 2 ein schematisches Temperaturprofil in der erfindungsgemäßen Vorrichtung,

die Figur 3 den Grad der Metabolit-Freisetzung aus den Mikroorganismen *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae* in Abhängigkeit von der angeleg-

ten Temperatur der Wärmequelle = T_K . Erst bei einer Konditionier-temperatur T_K über 60°C findet eine signifikante Freisetzung von Metaboliten statt. Bei einer Konditioniertemperatur T_K von ca. 95°C wird eine vollständige Freisetzung erreicht. Die Konditionier-zeit t_h betrug 1,2 s,

- die Figur 4 den Grad der Metabolit-Freisetzung bei E. coli in Abhängigkeit von der Zeit t_{halte} . In Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur T_K werden verschieden lange Konditionierzeiten t_h für eine vollständige Metabolitfreisetzung benötigt. Dabei muss eine Schwellentemperatur $T_{\text{krit, Metabolit}}$ überschritten sein,
- die Figur 5 die Entstehung von Ghosts bei einer Konditioniertemperatur T_K von 95°C in Abhängigkeit von der Konditionierzeit T_h bei einer E. coli-Kultur,
- die Figur 6 die Entstehung von Zelltrümmern durch die erfindungsgemäße Vorrichtung bei einer Konditioniertemperatur T_K von 95°C in Abhängigkeit von der Konditionierzeit t_h bei E. coli,
- die Figur 7 die Entstehung von Ghosts in Abhängigkeit von der Konditionier-temperatur T_K bei einer Konditionierzeit T_h von 1,2 s bei einer Probennahme aus einer E. coli-Kultur mittels der erfindungsge-mäßen Vorrichtung,
- die Figur 8 den überraschenden Zusammenhang zwischen Trümmer-Bildung, Ghost-Bildung, Metabolit-Freisetzung und GZZ in Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur T_K ,
- die Figur 9 die Abhängigkeit der Bildung von Ghosts von den angelegten Wärmeäquivalenten. Nur in einem sehr engen Bereich von 70 bis 300 Ks WE erfolgt bei E. coli eine sehr befriedigende Bildung ei-

ner vorteilhaft hohen Zahl von Ghosts, das Optimum liegt dabei bei 110 Ks,

die Figur 10 das Ergebnis der Analyse der erfindungsgemäß bei der Probenahme und –überführung freigesetzten Metabolite ausgewählter Stoffklassen (Legende: PEP = Phosphoenolpyruvat, DHAP/GAP = Summe von Dihydroxyacetophosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, 2PG/3PG = Summe aus 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat, FBP = Fructose-bisphosphat).

Beispiel 1: Freisetzung von Metaboliten

Die Fähigkeit der erfindungsgemäßen Vorrichtung, in Form eines integrierten Probennahmesystems intrazelluläre Metabolite freizusetzen, wurde exemplarisch am Beispiel der Freisetzung von ATP verfolgt. Die ATP-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines enzymatischen Biolumineszenz-Verfahrens ermittelt (Tran & Unden Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation Eur. J. Biochem. (1998) 251:538-43). ATP liegt vermutlich aufgrund lysierter Zellen im Medium von Zellsuspensionen wie die meisten Metabolite in der Regel nur in minimalen Mengen vor. Aufgrund seiner ionischen Phosphatgruppen kann ATP nur in äußerst vernachlässigbarer Menge über die Cytoplasmamembran diffundieren. Die Metabolitfreisetzungversuche wurden mit *E. coli*-Kulturen als charakteristische Vertreter gram-negativer prokaryotischer Zellsuspensionen, mit *B. subtilis*-Kulturen als charakteristische Vertreter gram-positiver prokaryotischer Zellsuspensionen, und mit *S. cerevisiae*-Kulturen als charakteristische Vertreter eukaryotischer Zellsuspensionen durchgeführt. Eine vollständige Metabolit-Freisetzung sei im folgenden definiert als Nachweis von mehr als >95% der ATP-Menge, die bei einem schnellen Abstoppen der Zellsuspension mit kochendem Wasser für 2 Minuten und anschließendem Ultra-

schall-Aufschluss (30s, Ultraschallgerät, Bandelin electronic, Typ UW 2200, 12207 Berlin, Deutschland) nachgewiesen werden kann.

1.1 Freisetzung von Metaboliten: Abhängigkeit von der Konditionierzeit t_h

Bei einer gegebenen Temperatur $T_{\text{Wärmequelle}}$, die der Konditioniertemperatur T_K entspricht, spielt die Haltezeit t_{halte} , die der Konditionierzeit t_h entspricht, eine wichtige Rolle für den Grad der Metabolit-Freisetzung. Um den Einfluss der Konditionierzeit t_h bei der Metabolit-Freisetzung zu untersuchen, wurde für *E. coli* bei verschiedenen Temperaturen (30°C, 60°C und 95°C) die Konditionierzeit t_h variiert. Die Ergebnisse sind in Figur 4 dargestellt. Bei Konditioniertemperatur $T_K = 95^\circ\text{C}$ wird eine vollständige Metabolit-Freisetzung bereits bei Konditionierzeiten t_h wesentlich unter einer Minute erreicht. Bei Konditioniertemperatur $T_K = 60^\circ\text{C}$ wird im Rahmen der Versuchszeit erst bei Konditionierzeit $t_h = 5 \text{ min.}$ eine vollständige Metabolitfreisetzung erreicht. Bei tieferen Temperaturen wird keine vollständige Metabolit-Freisetzung innerhalb eines akzeptablen Zeitraumes (<5 min.) mehr erreicht, bei einer Konditioniertemperatur T_K von 37°C wird sogar überhaupt kein Anstieg der Metabolit-Freisetzung mehr beobachtet. Die durch die Wärmequelle angelegte Konditioniertemperatur T_K muss also eine Schwellentemperatur $T_{\text{krit,min}}$ übersteigen, damit im Rahmen einer vernünftigen Zeitspanne der Konditionierzeit t_h von vorzugsweise weniger als 5 min. eine vollständige Freisetzung der intrazellulären Metabolite erreicht werden kann.

1.2 Freisetzung von Metaboliten: Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur T_K

Die Abhängigkeit des Grades der Metabolit-Freisetzung von der Konditioniertemperatur T_K bei einer gegebenen Konditionierzeit t_h von 1,2 s wurden mit *E. coli*, *B. subtilis*- und *S. cerevisiae*-Kulturen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in

Figur 3 dargestellt. Während bis zu einer Konditioniertemperatur T_K von 60°C keine signifikante Freisetzung von Metaboliten beobachtet werden kann, steigt der Freisetzungsgrad bei höheren Konditioniertemperaturen signifikant an und erreicht bei allen drei Zellsystemen bei spätestens 95°C eine vollständige Freisetzung der Metabolite. *B. subtilis* als gram-positiver Organismus zeigt gegenüber *S. cerevisiae* und *E. coli* erst bei höheren Temperaturen vergleichbare Anteile freigesetzter Metabolite.

Beispiel 2: Bewahrung der strukturellen Integrität

Für die Bewahrung der strukturellen Integrität von Zellen wurden im Hinblick auf das integrierte Probennahmesystem zwei entscheidende Einflussgrößen, vergleichbar mit der Metabolit-Freisetzung, identifiziert: Die Konditionierzeit t_h , die bei der vorzugsweise eingesetzten erfindungsgemäßigen Vorrichtung der t_{halte} entspricht, und die angelegte Konditioniertemperatur T_K , die bei der vorzugsweise eingesetzten erfindungsgemäßigen Vorrichtung der Temperatur $T_{\text{Wärmequelle}}$ der mit der Kapillare verbundenen Wärmequelle entspricht.

Der Nachweis der „Ghosts“ erfolgt zweckmäßigerweise über den Farbstoff Propidiumiodid, der aufgrund seiner positiven Ladung nur durch geschädigte Membranen permeieren kann. Propidiumiodid interkaliert in die DNA und fluoresziert daraufhin rot, weshalb auch Ghost-Zellen rot fluoreszieren. Quantitativ wurden Ghosts in der vorliegenden Patentschrift mit Hilfe des Ghost-Faktor nachgewiesen.

Der quantitative Nachweis von Ghosts erfolgt über den Ghost-Faktor. Dieser ergibt sich anhand der Formel:

$$\text{Ghost-Faktor} = ((\text{rot_P} - \text{rot_Ü_P}) - (\text{rot_Ref} - \text{rot_Ü_Ref})) / (\text{grün_Ref} - \text{grün_Ü_Ref})$$

Hierbei ist:

rot_P = Rot-Fluoreszenz der behandelten Probensuspension

| | |
|------------|--|
| rot_Ü_P | = Rot-Fluoreszenz der behandelten, abzentrifugierten Probensuspension |
| rot_Ref | = Rot-Fluoreszenz der unbehandelten Probensuspension |
| rot_Ü_Ref | = Rot-Fluoreszenz der unbehandelten, abzentrifugierten Probensuspension |
| grün_Ref | = Grün-Fluoreszenz der unbehandelten Probensuspension |
| grün_Ü_Ref | = Grün-Fluoreszenz der unbehandelten, abzentrifugierten Probensuspension |

Die Rot-Fluoreszenz wurde bei 635 nm und die Grün-Fluoreszenz bei 535 nm in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Messgerätes (TECAN GmbH, Typ Spectra Fluor, Crailsheim, Deutschland) ermittelt. Die Anregung erfolgt bei 485 nm. Bei der Messprobenvorbereitung wurde die optische Dichte der Probensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt und die Probensuspension im Anschluss mittel 0,9% NaCl-Lösung auf eine Extinktion von 0,06 bei 600 nm verdünnt. Die Probensuspension wurde darauf in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde auf Eis gelagert und mit "Probensuspension" bezeichnet. Das zweite Aliquot wurde für 2 min. bei 14000 Umdrehungen/Minute in einer Tischzentrifuge (Eppendorf AG, Typ Centrifuge 5417R, 22331 Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, anschließend der Überstand abgenommen. Diese Aliquot wurde als "abzentrifugierte Probensuspension" bezeichnet. Im Anschluß wurden bei Aliquots gleich weiterprozessiert. Dazu wurden 100 µl der Aliquots in die Kavität einer Mikrotiterplatte gegeben, anschließend 100 µl eines Farbstoffgemisches zugegeben. Das Farbstoffgemisch wurde aus der Komponente A des L-7007 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability-Kit (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) gewonnen und beinhaltete 10 µmol/l SYTO® 9 und 10 µmol/l Propidiumiodid in bidestilliertem Wasser. Die Bezeichnung behandelt bzw. unbehandelt kennzeichnet hierbei Probensuspensionen, die entweder direkt aus dem Kultivierungssystem entnommen wurden (unbehandelt) bzw. daraufhin entweder durch das integrierte Probennahmesystem

prozessiert bzw. durch alternative Methoden und Verfahren konditioniert worden waren (behandelt).

Der Nachweis der „Trues“ erfolgt über den Farbstoff SYTO® 9. Dieser ist ungeladen und kann somit sowohl durch intakte als auch durch beschädigte Membranen in die DNA interkalieren. Daher markiert er, wenn er alleine verwendet wird, alle Zellen, sowohl die mit intakter (Trues) als auch die mit beschädigter (Ghosts) Membran. In Kombination mit Propidiumiodid eingesetzt (wie hier der Fall) wird SYTO® 9 durch Propidiumiodid reduziert und verdrängt. Daher fluoreszieren nur Zellen mit intakten Membranen (Trues) grün.

Der quantitative Nachweis von Trümmern erfolgt über den Trümmer-Faktor.

Dieser ergibt sich anhand der Formel:

$$\text{Trümmer-Faktor} = (\text{rot_Ü_P}-\text{rot_Ü_Ref})/(\text{rot_P}-\text{rot_Ref}) * (\text{rot_P}-\text{rot_Ref})/(\text{grün_Ref}-\text{grün_Ü_Ref})$$

Hierbei ist:

rot_Ü_P = Rot-Fluoreszenz der behandelten, abzentrifugierten Zellsuspension

rot_Ü_Ref = Rot-Fluoreszenz der unbehandelten, abzentrifugierten Zellsuspension

rot_P = Rot-Fluoreszenz der behandelten Zellsuspension

rot_Ref = Rot-Fluoreszenz der unbehandelten Zellsuspension

grün_Ref = Grün-Fluoreszenz der unbehandelten Probensuspension

grün_Ü_Ref = Grün-Fluoreszenz der unbehandelten, abzentrifugierten Probensuspension

Die Durchführung der Messung des Trümmer-Faktors entspricht der Vorgehensweise bei der Bestimmung des Ghost-Faktors. Der Trümmer-Faktor misst dabei hauptsächlich nackte DNA-Bruchstücke.

Die Gesamtzellzahl (GZZ) wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer, impro ved) unter dem Lichtmikroskop bestimmt und entspricht der Summe aus Trues und Ghosts.

2.1 Bewahrung der strukturellen Integrität: Abhängigkeit von der Konditio nierzeit t_h

Um die Abhängigkeit der strukturellen Integrität von der Konditionierzeit t_h zu untersuchen, wurden bei einer Konditioniertemperatur T_K von 95°C verschiedene Konditionierzeiten t_h angelegt. Die Ergebnisse sind in Figur 5 dargestellt.

Definitionsgemäß ergibt der Ghost-Faktor bei der unbehandelten Zellsuspension einen Wert von 0. Dieser steigt bei einer Konditionierzeit t_h von 1,2 s überraschenderweise sprunghaft auf 1,01 an. Er sinkt wiederum ab Konditionierzeiten t_h ab 5 s schnell auf 0,56, um im weiteren Verlauf mit längerer Zeitdauer weiter stetig abzusinken, wie in Figur 5 dargestellt ist. Es kann daher geschlossen werden, dass nur eine überraschend kurze Konditionierzeit t_h für die Beibehaltung der zellulären Integrität der Zellen angelegt werden muss; bei langer Zeiteinwirkung und Temperaturen T_K über $T_{\text{krit},\text{min}}$ geht die zelluläre Integrität jedoch unerwünschterweise verloren.

Im Gegensatz zu anderen Zellaufschlussmethoden zur Metabolit-Freisetzung, wie beispielsweise der Rührwerkskugelmühle oder dem Ultraschall, entstehen bei dem integrierten Probennahmesystem in wesentlich geringerem Ausmaß Zelltrümmer; die gefundenen Messwerte sind in Tabelle 2 dargestellt. Diese entstehen in Abhängigkeit von der angelegten Temperatur $T_{\text{Wärme quelle}} > T_{\text{krit},\text{min}}$ und nehmen mit der Zeit zu, siehe Figur 6.

Tabelle 2 zeigt den Trümmer-Faktor bei Probennahme und Metabolit-Freisetzung nach Behandlung der Zellsuspension mittels des integrierten Probennahmesystems, mittels Rührwerkskugelmühle und mittels Ultraschall-Aufschluss. Rührwerkskugelmühle und Ultraschall-Aufschluss zerstören die

Zellintegrität und erzeugen eine wesentlich höhere Menge an Zelltrümmern als das erfindungsgemäße Verfahren.

Tabelle 2:

| Thermische Konditionierung (erfindungsgemäß) | | Trümmer-Faktor |
|--|----------------------------|----------------|
| Konditioniertemperatur T_K [°C] | Konditionierzeit t_h [s] | |
| 95 | 1,2 | 0,00 |
| 95 | 20 | 0,05 |
| 95 | 45 | 0,04 |
| Rührwerkskugelmühle für 11 min. (Vergleich) | | 0,72 |
| Ultraschallaufschluss für 30 s (Vergleich) | | 0,99 |

2.2. Bewahrung der strukturellen Integrität: Abhängigkeit von der Konditioniertemperatur T_K

Um die Abhängigkeit der strukturellen Integrität von der Temperatur zu untersuchen, wurden die Folgen von Temperatur-Variationen auf die Entstehung von Ghosts analysiert. Ghosts sind Zellen, deren Metabolite freigesetzt wurden, die ihre strukturelle Integrität jedoch beibehalten haben.

Die Ergebnisse bei einer Konditionierzeit t_h von 1,2 s sind in Figur 7 dargestellt. Während bis zu Konditioniertemperaturen T_K von 75°C nur ein schwacher Anstieg von Ghosts, gemessen am Ghost-Faktor, erfolgt, steigt dieser bei höheren Konditioniertemperaturen sprunghaft an und erreicht bei einer Konditioniertemperatur T_K von etwa 85°C ein Maximum. Bei Konditioniertemperaturen von 90°C und 95°C ist eine geringe Abnahme des Ghost-Faktors zu beobachten, siehe Figur 7. Im Vergleich zu bekannten Metabolit-Freisetzungsv erfahren (Kugelmühle, Ultraschall) erzeugt die Freisetzung von Metaboliten mittels des er-

findungsgemäßen Verfahrens vorteilhafterweise wesentlich mehr Ghosts als die bekannten Verfahren; dies ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 zeigt den Ghost-Faktor bei Probennahme und Metabolit-Freisetzung nach Behandlung der Zellsuspension mittels des integrierten Probennahmesystems, mittels Rührwerkskugelmühle und mittels Ultraschall-Aufschluss. Rührwerkskugelmühle und Ultraschall-Aufschluss zerstören die Zellintegrität und erzeugen eine wesentlich höhere Menge an Zelltrümmern als das Integrierte Probennahmesystem. Dagegen erzeugt das erfundungsgemäße Verfahren eine wesentlich größere Menge an Ghost als die Behandlung der Zellsuspension mittels Rührwerkskugelmühle oder Ultraschall.

Tabelle 3:

| Thermische Konditionierung (erfindungsgemäß) | | Ghost-Faktor |
|--|----------------------------|--------------|
| Konditioniertemperatur T_K [°C] | Konditionierzeit t_h [s] | |
| 95 | 1,2 | 1,01 |
| 95 | 20 | 0,57 |
| 95 | 45 | 0,41 |
| Rührwerkskugelmühle für 11 min. (Vergleich) | | -0,05 |
| Ultraschallaufschluss für 30 s (Vergleich) | | -0,12 |

Ein zugrunde liegendes Modell erfordert, dass die Gesamzellzahl GZZ die Summe aus Trues und Ghosts darstellt, dass sobald keine Trues mehr vorliegen, die Metabolitfreisetzung vollständig sein sollte, dass mit Abnahme der Ghosts die Zahl der Trümmer zunehmen sollte und dass es eine maximale Temperaturgrenze gibt, ab der vermehrt Zelltrümmer und keine Ghosts gebildet werden.

Diese Zusammenhänge wurden experimentell an *E. coli* für Kultivierungstemperaturen T_K im Bereich von 50°C bis 121°C untersucht. Bei Konditioniertemperaturen über 100°C mussten hierfür andere, das heißt erweiterte, Probenahmeverrichtungen als das erfindungsgemäß bevorzugte eingesetzt werden; um mittels eines angelegten Überdruckes wurde ein Sieden der Probensuspension stets vermieden. Die Konditionierzeit t_h wurde zwischen 1,2 s und 600 s variiert.

In Figur 8 sind die experimentellen Ergebnisse in der Zusammenschau dargestellt. Eine vollständige Metabolit-Freisetzung erfolgt, wenn alle Trues in Ghosts oder Trümmer umgewandelt wurden. Es konnte gezeigt werden, dass überraschenderweise bei bestimmten Konditioniertemperaturen T_K kritische Schwellenwerte erreicht werden. Der Verlauf des Ghost-Faktors, der ein Maß für die Zahl der gebildeten Ghosts ist, zeigt überraschenderweise ein Optimum bei einem Intervall von T_K von 65°C bis 105°C, insbesondere von 80°C bis 95°C.

Beispiel 3: Kombinatorisches Optimum: Wärmeäquivalente

Wie vorstehend dargestellt, resultiert der Einsatz von Ultraschall oder Rührwerkskugelmühle für die Metabolit-Freisetzung in einem nicht-selektiven Zellaufschluss mit einem hohen Anteil an Trümmern, siehe Tabellen 2 und 3. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann dagegen der Anteil von Trümmern signifikant reduziert, der Anteil von Ghosts bei gleichzeitiger Freisetzung von Metaboliten optimiert werden (Tabelle 3). Aus den vorstehend beschriebenen Untersuchungen ergibt sich, dass die Parameterkombination von Konditionierzeit t_h und Konditioniertemperatur T_K eine große Bedeutung für den Grad der Metabolit-Freisetzung und die Bewahrung der strukturellen Integrität der Zellen hat. Aus den Untersuchungen lässt sich bevorzugt folgendes einfache multifaktorielle Modell ableiten:

- (1) Konditioniertemperatur $T_K < T_{krit,min}$

Unterschreitet die angelegte Konditioniertemperatur T_K eine kritische Temperatur $T_{krit,min}$, so erfolgt aufgrund der Wärmebehandlung nur eine sehr langsame Freisetzung von Metaboliten und nur eine sehr langsame Bildung von Ghosts, wie durch einen tiefen Ghost-Faktor angezeigt.

- (2) $T_{krit,min} < \text{Konditioniertemperatur } T_K < T_{krit,max}$

und Konditionierzeit $t_h < t_{krit,min}$

In diesem Fall erfolgt die Bildung von Ghosts und damit korrelierend die Freisetzung von Metaboliten. Da jedoch die Konditionierzeit die minimale kritische Haltezeit $t_{krit,min}$ nicht übersteigt, ist die Bildung von Ghosts nicht maximal, es erfolgt keine vollständige Metabolit-Freisetzung.

- (3) $T_{krit,min} < \text{Konditioniertemperatur } T_K < T_{krit,max}$

und $t_{krit,min} < \text{Konditionierzeit } t_h < t_{krit,max}$

Bei diesem Szenario erfolgt eine optimale Bildung von Ghosts bei vollständiger Metabolit-Freisetzung.

- (4) $T_{krit,min} < \text{Konditioniertemperatur } T_K < T_{krit,max}$

und Konditionierzeit $t_h > t_{krit,max}$

Bei diesem Szenario erfolgt zwar eine vollständige Metabolit-Freisetzung, da jedoch die Konditionierzeit die maximale kritische Haltezeit $t_{krit,max}$ übersteigt, wird die strukturelle Integrität der Zellen beschädigt und aus den Ghosts entstehen signifikant Trümmer.

- (5) $\text{Konditioniertemperatur } T_K > T_{krit,max}$

Bei diesem Szenario erfolgt ebenfalls eine vollständige Metabolit-Freisetzung, da jedoch die angelegte Konditioniertemperatur die kritische maximale Temperatur $T_{krit,max}$ übersteigt, entstehen nur wenige Ghosts. Die Probensuspension ist daher nur sehr schlecht aufzuarbeiten.

Für die kritische minimale und maximale angelegte Temperatur in der durch die Wärmequelle temperierten Kapillare $T_{krit,min}$ und $T_{krit,max}$ konnten in Abhängigkeit von den eingesetzten Zellsystemen die in Tabelle 4 dargestellten Werte ermittelt werden.

Tabelle 4 zeigt kritische minimale und maximale angelegte Temperaturen $T_{krit,min}$ und $T_{krit,max}$ für verschiedene Zellsysteme: *E. coli*, *B. subtilis* und *S. cerevisiae*.

Tabelle 4:

| Beispielsystem | $T_{krit,min}$ | $T_{krit,max}$ |
|----------------------|----------------|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | 70°C | Siedepunkt der Probenlösung (105°C) |
| <i>B. subtilis</i> | 75°C | Siedepunkt der Probenlösung (105°C) |
| <i>S. cerevisiae</i> | 70°C | Siedepunkt der Probenlösung (105°C) |

Die kritischen minimalen und maximalen Haltezeiten $t_{krit,min}$ und $t_{krit,max}$ sind keine Konstanten, sondern hängen insbesondere von der angelegten Konditioniertemperatur ab. Um eine optimale Kombination der Parameter Konditionierzeit t_h und Konditioniertemperatur T_K für eine zweckmäßige Dimensionierung der erfundungsgemäßen Vorrichtung zu erreichen, wurden beide Größen über eine Multiplikation kombiniert, das Ergebnis des Produktes als Wärmeäquivalente (WE) mit der Einheit "K·s" bezeichnet. Vor der Multiplikation wurde von der angelegten Konditioniertemperatur T_K [°K] die Kultivierungs-temperatur T_M des Organismus [°K] subtrahiert.

Zum Beispiel liegt die Kultivierungstemperatur T_M bei *E. coli* vorzugsweise bei ca. 310°K; dies entspricht ca. 37°C. Das Optimum an WE konnte so für *E. coli* bei 110 ± 20 K·s ermittelt werden (Tabelle 5).

Für weitere biologische Systeme sind repräsentativ in Tabelle 5 weitere gefundene Optima (WE_opt) angegeben.

Tabelle 5:

| Beispielsystem für | | WE_min | WE_opt | WE_max |
|--------------------|----------------------------|--------|--------|--------|
| E. coli | gram-negative Prokaryonten | 70 | 110 | 300 |
| B. subtilis | gram-positive Prokaryonten | 90 | 130 | 300 |
| S. cerevisiae | Eukaryonten | 70 | 110 | 260 |

Beispiel 4: Geometrie des integrierten Probennahmesystems

Aus dem Wissen um die Abhängigkeit von der Größe „Wärmeäquivalent“ als eine Funktion der Konditionierzeit t_h , Konditioniertemperatur T_K und Kultivierungstemperatur T_M ergeben sich für die geometrische Auslegung zwingende geometrische Randbedingungen und Kriterien, deren Einhaltung für die (i.) ausreichend schnelle quantitative Metabolitfreisetzung (Schritte „Transfer“ durch das Totvolumen sowie „Quenching“), wobei die Zeitkonstanten der biochemischen Reaktionen (turnover) zu berücksichtigen sind, und (ii.) der Erziehung von Zellen der gewünschten Struktur, das heißt insbesondere „Ghost-Zellen“, durch die Wahl charakteristischer Konditionierzeiten unbedingt erforderlich ist. Eine weitere Randbedingung ergibt sich (iii.) aus den Anforderungen der subsequenten Analyse der Proben bezüglich des minimalen Probennahmeverolumens (Volumenstrom).

Die geometrische Auslegung muss gewährleisten, dass die ermittelte kritische Temperatur $T_{krit,min} < T_{krit} < T_{krit,max}$ (Schritt „Quenching“) innerhalb der Heizzeit t_{heiz} auf dem Streckenabschnitt s_{heiz} erreicht wird. Hierbei ist die

für das Quenching des Metabolismus erforderliche Zeitkonstanten t_{heiz} maßgebend.

Ausgehend von einer Bilanz der Wärmeströme lassen sich geometrische Beziehungen ableiten:

$$\rho \cdot \dot{V} \cdot c_p \cdot (T_{Suspension} - T_{WT}) = -Nu \cdot \lambda \cdot \pi \cdot s_{heiz} \cdot \frac{(T_{WT} - T_{Suspension}) - (T_{WT} - (T_{WT} - 5K))}{\ln \frac{(T_{WT} - T_{Suspension})}{(T_{WT} - (T_{WT} - 5K))}} \quad (\text{Gl.1})$$

T_{WT} ist in unserem System gleichzusetzen mit $T_{Wärmequelle}$. Unter Verwendung einer geeigneten Kriteriengleichung der Form $Nu = c \times Re \times Prn$ für die Nusselt-Zahl (VDI-Wärmeatlas) folgt (Gl.2):

$$\rho \cdot \dot{V} \cdot c_p \cdot (T_{Suspension} - T_{Wärmequelle}) = -(3.953 + 0.0864 [1 + 0.8 \cdot \left(\frac{d}{D}\right)^{0.9}]) \cdot \left(\frac{4 \cdot \dot{V}}{\pi \cdot d \cdot v}\right)^{0.652} \cdot 3.4^{1/3} \cdot \lambda \cdot \pi \cdot s_{heiz} \cdot 58K$$

Im Folgenden sind Stoffdaten (auf der Basis von Wasser, temperaturgemitteilt), dimensionslose Kenngrößen Re und Pr zur Berechnung von Fluidodynamik und Wärmeübergang sowie geometrische Größen (d , D) des verwendeten Probennahmesystems aufgelistet:

| | |
|--|-------------------|
| Re | 4900 |
| $Re = 0,5 \cdot [Re(35^\circ C) + Re(90^\circ C)]$ | |
| Pr | 3,4 |
| $Pr = 0,5 \cdot [Pr(35^\circ C) + Pr(90^\circ C)]$ | |
| c/m/n, mit $m = m(d, D)$ | 0,083/0,652/0,333 |
| d | 2,03 mm |
| D | 57 mm |
| w | 1,08 m/s |
| ΔT_m | 58 K |

761 W

Q

Mit den auf der Basis von Wasser temperaturgemittelten Stoffwerten ($\rho = 0.979$ mg/l, $cp = 4,192$ kJ/(kg K), $v = 0,525 \times 10^{-6}$ m²/s, $\lambda = 0,652$ W/(m K) sowie als technischen Randbedingungen eine mindestens erforderliche Probennahmefrequenz von $f = 5$ s⁻¹ (entsprechender Volumenstrom von mindestens 2,5 ml/s) und ein Windungsdurchmesser der Rohrwendel von 0,057m (siehe Tabelle 6 für Stoffdaten, dimensionslose Kennzahlen zur Berechnung von Fliddynamik und Wärmeübergang sowie den geometrischen Größen d, D) folgt für die geometrische Auslegung zunächst folgende Gleichung (Gl.3):

$$S_{\text{heiz}} = \frac{1}{0.618 + 0.02 \cdot [1 + 0.8 \cdot \left(\frac{d}{0.057}\right)^{0.9}] \cdot \left(\frac{6.06}{d}\right)^{0.5+0.2903 \cdot \left(\frac{d}{0.057}\right)^{0.194}}}$$

Die Anzahl der zu übertragenden Wärmeäquivalente durch das integrierte Probennahmesystem ist eine Funktion der verwendeten Organismen, d.h. der spezifischen intrazellulären Metabolit-Poolkonzentrationen, und hat durch eine geeignete Dimensionierung derart zu erfolgen, dass in der für den Vorgang Transport durch das Totvolumen und den Vorgang Quenching benötigten Zeit maximal 10% dieser Poolkonzentration auf der Probennahmestrecke umgesetzt werden kann. Ein Verlust von 10% der Poolkonzentrationen kann im Hinblick auf quantitative Analysen gerade noch akzeptiert werden. Wegen des hohen turnover wurde für die Berechnungen der ATP-turnover herangezogen. Intrazelluläre ATP-Konzentrationen, spezifischen ATP-Bildungsraten und turnover τ für die betrachteten Organismen sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Die Tabelle 6 zeigt Intrazelluläre ATP-Konzentrationen, spezifischen ATP-Bildungsraten und turnover τ für verschiedene Zellsysteme. Das Zellsystem E. coli repräsentiert gram-negative Prokaryonten, B. subtilis gram-positive Prokaryonten, S. cerevisiae einzellige eukaryotische Systeme. Extremwerte sind $\tau_{\text{ATP}} = 0,1$ s und $\tau_{\text{ATP}} = 3$ s.

Tabelle 6:

| Verdünnungsrate D = 0,1 h⁻¹ | | | |
|---|--------------------|------------------------|-------------|
| Zellsystem | cATP [µmol/gTS] | qATP [mmol/(gTS h)] | τATP [s] |
| E. coli | 0,7-7,6 | 13-25 | 0,1-2,1 |
| B. subtilis | 1,8 | 15,5 | 0,4 |
| S. cerevisiae | 0,4-8,0 | 10,8 | 0,1-2,7 |

| Verdünnungsrate D = 0,4 h⁻¹ | | | |
|---|--------------------|------------------------|-------------|
| Zellsystem | cATP [µmol/gTS] | qATP [mmol/(gTS h)] | τATP [s] |
| E. coli | 8,7 | 60,5 | 0,5 |
| B. subtilis | 1,8 | 55,2 | 0,1 |
| S. cerevisiae | 0,4-8,0 | 69,8 | ca. 0,4 |

Dann gilt (Gl.4):

$$d = \left(\frac{4 \cdot V \cdot 0,1 \cdot c_{ATP}}{\eta_{turnover(ATP)} \cdot \pi \cdot s_{heiz}} \right)^{0,5}$$

Die Lösung der Wärmebilanz gemäß Gl.1 lieferte die für die Übertragung der Wärmeäquivalente erforderliche Heizstrecke s_heiz des Vorgangs Quenching. Diese ist eine Funktion des Rohrwendel-Innendurchmessers nach Gl.3 und Gl.4.

Ist die kritische Temperatur $T_{krit,min} < T_{krit} < T_{krit,max}$ erreicht, müssen auf der Probennahmestrecke s_{halte} die Wärmeäquivalente übertragen werden (Figur 9). Die von der Geometrie abhängige Zeit t_{halte} ergibt sich zu (Gl.5):

$$t_{halte} = \frac{WE_{opt}}{T_{Wärmequelle} - T_{Suspension}} - \frac{\pi \cdot d^2}{\sqrt{2.472 + 0.08 \cdot [1 + 0.8 \cdot \left(\frac{d}{0.057}\right)^{0.9}] \cdot \left(\frac{6.06}{d}\right)^{0.5+0.2903 \cdot \left(\frac{d}{0.057}\right)^{0.194}}}}$$

Für die Haltestrecke s_{halte} gilt (Gl. 6):

$$s_{halte} = t_{halte} \cdot w$$

und damit für die gesamte temperierte Strecke $s_{Wärmequelle}$ (Gl. 7):

$$s_{Wärmequelle} = s_{halte} + s_{heiz}$$

Eine bevorzugte apparative Umsetzung ist insbesondere in Form einer Rohrwendel mit den charakteristischen geometrischen Abmessungen wie nachstehend dargestellt, erfüllbar:

$$\text{Rohrwendel-} \quad d_i = 2.8 \text{ mm} - 2.2 / +1.7 \text{ mm}$$

Innendurchmesser:

$$\text{Heizstrecke:} \quad s_{heiz} = 16 \text{ cm} \pm 6 \text{ cm}$$

$$\text{Geometriekennzahl:} \quad d_i/s_{heiz} = 0.0175 \pm 0.0135$$

$$\text{temperierte Kapillarstrecke:} \quad s_{Wärmequelle} = 240 \text{ cm} - 160 / +1271 \text{ cm}$$

Die Abweichungen der einzelnen geometrischen Größen vom angegebenen optimalen Wert können sich je nach Zellsystem und Kultivierungsbedingungen, spezifischen Turnoverzeiten (vgl. Tabelle 6) sowie je nach Volumenstrom, der bevorzugt zwischen 2,5 und 8 ml/s eingestellt wird, ergeben. Bei kleinen Innen-durchmessern von $d_i < 1,2 \text{ mm}$ ist bei Verwendung von Gl. 3 der Windungs-

durchmesser der Rohrwendel vorzugsweise zu verkleinern (lt. VDI-Wärmeatlas).

Symbolverzeichnis:

| Symbol | Bezeichnung | Einheit |
|--------------|---|-------------|
| \dot{V} | Volumenstrom durch integrierte Probennahme | m^3/s |
| f | Probennahmefrequenz | s^{-1} |
| τ | turnover | s |
| ρ | Dichte | kg/m^3 |
| w | mittlere Strömungsgeschwindigkeit | m/s |
| d_i | Rohrwendel-Innendurchmesser | m |
| D | Windungsdurchmesser | m |
| ΔT_m | mittlere logarithmische Temperaturdifferenz | K |
| Re | Reynolds-Zahl | |
| Pr | Prandtl-Zahl | |
| Nu | Nusselt-Zahl | |
| c,m,n | Koeffizienten bzw. Exponenten | |
| cp | spezifische Wärmekapazität | $kJ/(kg K)$ |
| ν | kinematische Zähigkeit | m^2/s |
| η | dynamischen Zähigkeit | $kg/(m s)$ |
| λ | Wärmeleitzahl | $W/(m K)$ |

Beispiel 5: Gewinnung und Analyse intrazellulärer Metabolite

Der E.coli-Stamm K-12 wurde steril in einem Bioreaktor (KLF 2000, Bioengineering, Wald, Schweiz) bei einer Kultivierungstemperatur T_M (entspricht $T_{\text{suspension}}$) von 37°C, entsprechend 310°K, kultiviert. Unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung einer integrierten Probennahme, die mit folgenden Parametern betrieben wurde, wurden Proben konditioniert:

| | |
|---|----------|
| Volumenstrom | 3,5 ml/s |
| Kapillarinndurchmesser, d_i | 2,03 mm |
| Länge der temperierten Kapillarstrecke, $s_{Wärmequelle}$ | 205 cm |
| Konditioniertemperatur T_K , | 95°C |
| $T_{Wärmequelle}$ | |

Bei einer Konditioniertemperatur T_K von 95°C und einer Konditionierzeit t_h von 1,9 s wurde erfindungsgemäß ein Wärmeäquivalent WE von 110 Ks übertragen.

Ergebnis I:

Die Zellsuspension konnte während der Probennahme simultan gequenched und selektiv aufgeschlossen werden.

Die Analyse der aus den konditionierten Zellen freigesetzten Metabolite erfolgte mittels Ionenchromatographie (Dionex DX500) und LC-MS (Thermo Quest Finnigan AQA) nach einem einfachen Filtrationsschritt mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm), worin die Zellhüllen (Ghosts) und eventuell noch vorhandene intakte Zellen (Reals), zurückgehalten wurden.

Durch wiederholte erfindungsgemäße Probennahme wurde der zeitliche Verlauf ausgewählter intrazellulärer Metabolitkonzentrationen einer steady-state E. coli-Kultur bei $D=0,1 \text{ h}^{-1}$ mit der Biomassekonzentration im Bioreaktor von $c=2,30 \text{ g/l}$ (in g Trockengewicht) beobachtet, nachdem zum Zeitpunkt $t=0 \text{ s}$ ein extrazellulärer Puls von 0,3 g/l Glucose in den Bioreaktor gegeben wurde. Gemessen wurden beispielhaft PEP = Phosphoenolpyruvat, DHAP/GAP = Summe von Dihydroxyacetophosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, 2PG/3PG = Summe aus 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat sowie FBP = Fructosebisphosphat.

Ergebnis II:

Die Figur 10 zeigt das Ergebnis der Analyse der erfindungsgemäß bei der Probennahme und –überführung freigesetzten Metabolite ausgewählter Stoffklassen. Legende: PEP = Phosphoenolpyruvat, DHAP/GAP = Summe von Dihydroxyacetophosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, ADP = Adenosindiphosphat, 2PG/3PG = Summe aus 2-Phosphoglycerat und 3-Phosphoglycerat, FBP = Fructosebisphosphat.

Ansprüche

1. Verfahren zum thermischen Konditionieren einer biologischen Zelle, wobei die Zelle bei einer Kultivierungstemperatur T_M in einem Kulturmedium kultiviert wird und anschließend für eine Konditionierzeit t_h bei einer Konditioniertemperatur T_K konditioniert wird,
dadurch gekennzeichnet, dass das Wärmeäquivalent WE , gemäß der Formel
$$WE = t_h \cdot (T_K - T_M)$$
von 70 K· s bis 300 K· s beträgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konditioniertemperatur T_K von 65°C bis 105°C, bevorzugt von 80°C bis 95°C, beträgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konditioniertemperatur T_K stets unter dem Siedepunkt des Kulturmediums liegt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Konditionierzeit t_h von 0,5 s bis 600 s, bevorzugt von 1 s bis 180 s, beträgt.
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kultivierungstemperatur T_M von 26°C bis 42°C, bevorzugt von 30°C bis 38°C, beträgt.
6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Wärmeäquivalent WE von 90 K· s bis 150 K· s beträgt.

7. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die biologische Zelle ein gram-negativer Prokaryont wie *E. coli* oder ein Eukaryont wie *S. cerevisiae* ist und das Wärmeäquivalent **WE** $110 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$ beträgt.
8. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Zelle ein gram-positiver Prokaryont wie *B. subtilis* ist und das Wärmeäquivalent **WE** $130 \pm 20 \text{ K} \cdot \text{s}$ beträgt.
9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das Kulturmödium ein flüssiges Medium ist und das thermische Konditionieren dadurch erfolgt, dass die biologische Zelle enthaltende flüssige Medium in einer Kapillare fließt, wobei sich die Zelle für eine Konditionierzeit t_h innerhalb einer auf die Konditioniertemperatur T_K temperierten Kapillarstrecke der Kapillare befindet.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Volumenstrom in der temperierten Kapillarstrecke von 0,5 ml/s bis 12 ml/s, bevorzugt von 2,5 ml/s bis 8,0 ml/s, beträgt.
11. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Schritt der thermischen Konditionierung mit der Überführung des die biologischen Zellen enthaltenden Kulturmödiums aus einem Kultivierungsgefäß, insbesondere einem Bioreaktor, in ein Auffanggefäß, insbesondere ein Probensammelgefäß, durchgeführt wird.
12. Verfahren zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs aus einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:
 - a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmödium,

- b) thermisches Konditionieren der Zelle gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Inhaltsstoff aus der thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) Isolieren des freigesetzten Inhaltsstoffs aus dem Kulturmedium.

13. Verfahren zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der Zelle gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Inhaltsstoff aus der thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) quantitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs im Kulturmedium.

14. Verfahren zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, enthaltend die Schritte:

- a) Kultivieren der Zelle in einem Kulturmedium,
- b) thermisches Konditionieren der Zelle gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei der Inhaltsstoff aus der thermisch konditionierten Zelle freigesetzt wird, und
- c) qualitativer Nachweis des freigesetzten Inhaltsstoffs im Kulturmedium.

15. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Inhaltsstoff ein intrazellulärer Metabolit, ausgewählt aus der Gruppe der Aminosäuren, Aminen und deren Derivate, der Carboxylsäuren, der Alkohole, der Aldehyde, der Ketone, der Phosphatester (ohne die Nukleinsäuren), der Nukleinsäuren und verwandter Verbindungen, der Zucker und verwandter Verbindungen, der Lipide, der Steroide, der Fettsäuren, der Vitamine, der Coenzyme und der anorganischen Ionen ist.

16. Zellkonditionievorrichtung mit Probenüberführungsstrecke (5), Probensammelvorrichtung (6) und mindestens einer an einer Wärmequelle (4) angeordneten und vom flüssigen Kulturmedium durchflossenen Kapillare (3) mit einem Innendurchmesser von 0,5 mm bis 4,5 mm, bevorzugt von 1,0 mm bis 3,0 mm, wobei die Kapillare entlang einer temperierten Kapillarstrecke von 50 cm bis 1550 cm, bevorzugt von 90 cm bis 420 cm mit der Wärmequelle in Kontakt steht.

17. Zellkonditionievorrichtung nach Anspruch 16, wobei für ein zu übertragendes Wärmeäquivalent von 70 Ks bis 300 Ks zweckmäßigerweise eine Länge der temperierten Kapillarstrecke von etwa 80 cm bis etwa 1510 cm gewählt wird, wobei

- a) für einen kleinen Volumenstrom von etwa 2,5 ml/s
 - i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 0,5 mm,
 - ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 2 mm und

- b) für einen großen Volumenstrom von etwa 8 ml/s
 - i. bei einer unteren Umsatzrate des Metaboliten von etwa 0,1 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 1 mm,
 - ii. bei einer oberen Umsatzrate des Metaboliten von etwa 2,7 s der Innendurchmesser der Kapillare etwa 4 mm

beträgt.

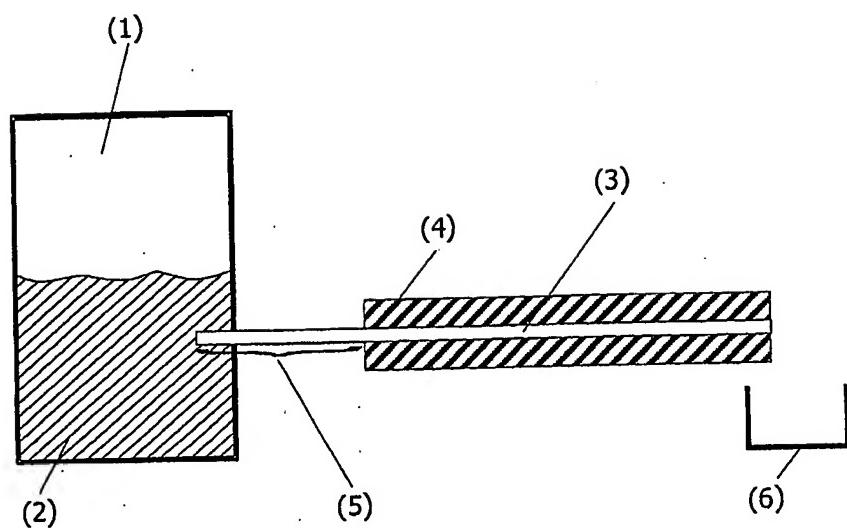
18. Zellkonditionievorrichtung nach Anspruch 16 oder 17, wobei die Zellkonditionievorrichtung als Probennahmeverrichtung zur Entnahme einer Probe aus einer Quelle (1) eines die Zelle enthaltenden flüssigen Kulturmediums (2) ausgebildet ist.

19. Verwendung der Zellkonditionievorrichtung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zur Gewinnung eines Inhaltsstoffs aus einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das Verfahren nach Anspruch 12 durchgeführt wird.

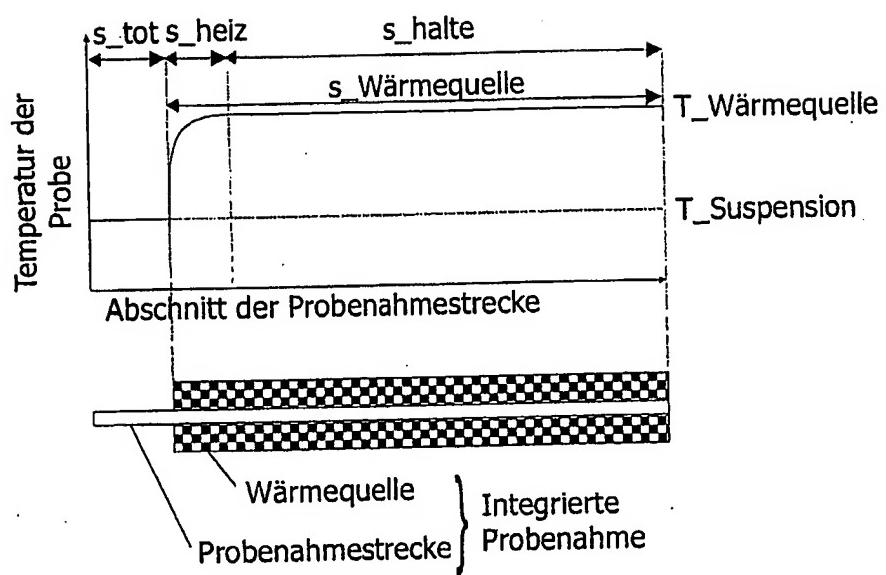
20. Verwendung der Zellkonditionievorrichtung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zum quantitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das Verfahren nach Anspruch 13 durchgeführt wird.

21. Verwendung der Zellkonditionievorrichtung gemäß einem der Ansprüche 16 bis 18 zum qualitativen Nachweis eines Inhaltsstoffs in einer biologischen Zelle, wobei insbesondere das Verfahren nach Anspruch 14 durchgeführt wird.

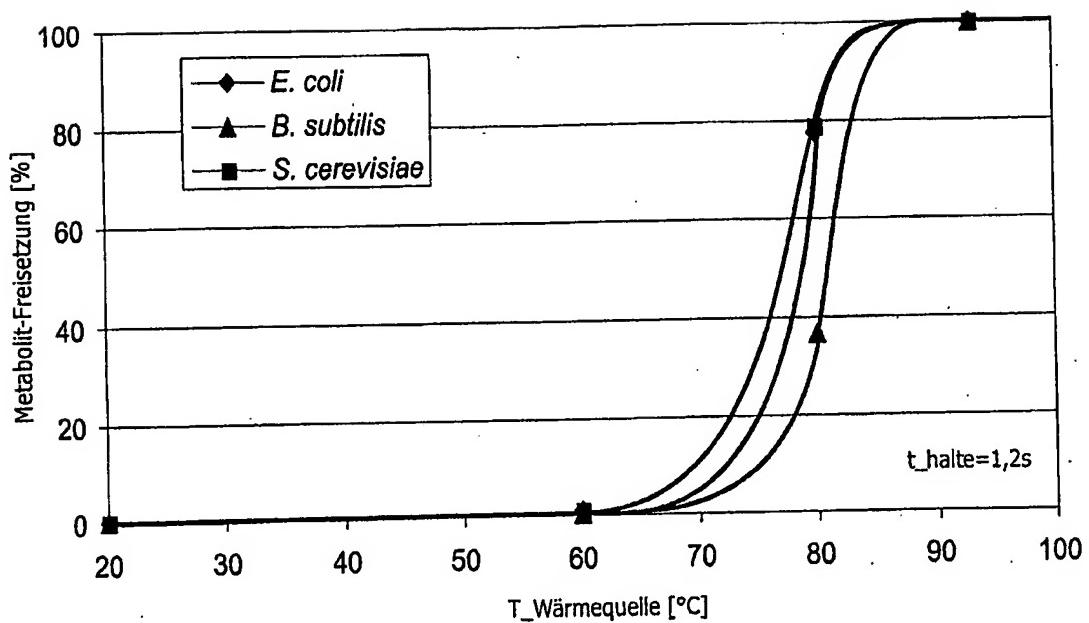
1/10

**Figur 1**

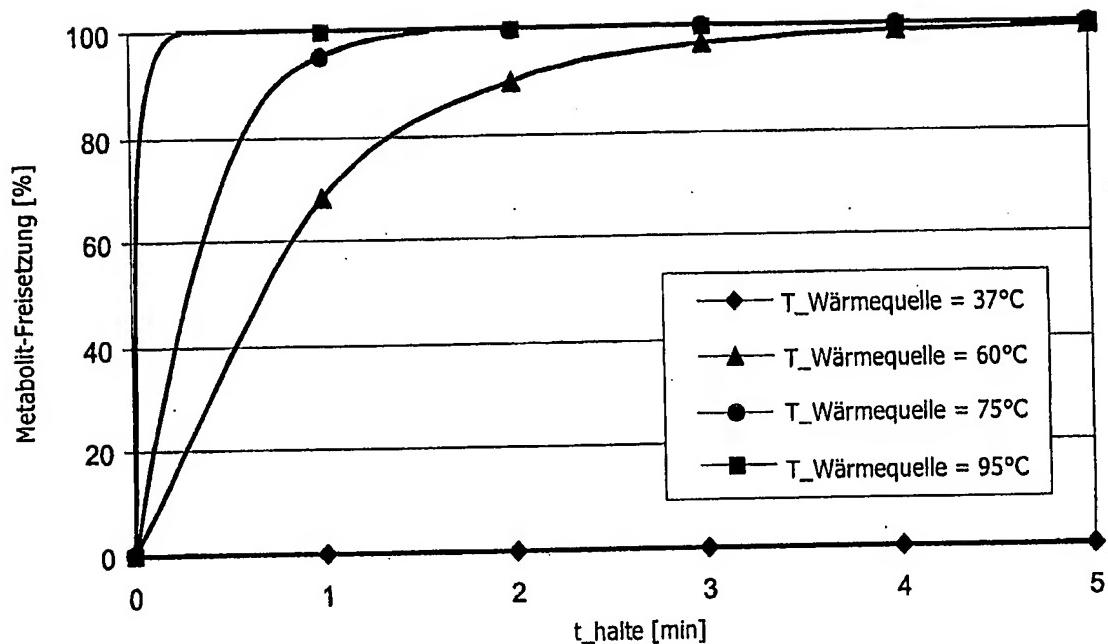
2/10

**Figur 2**

3/10

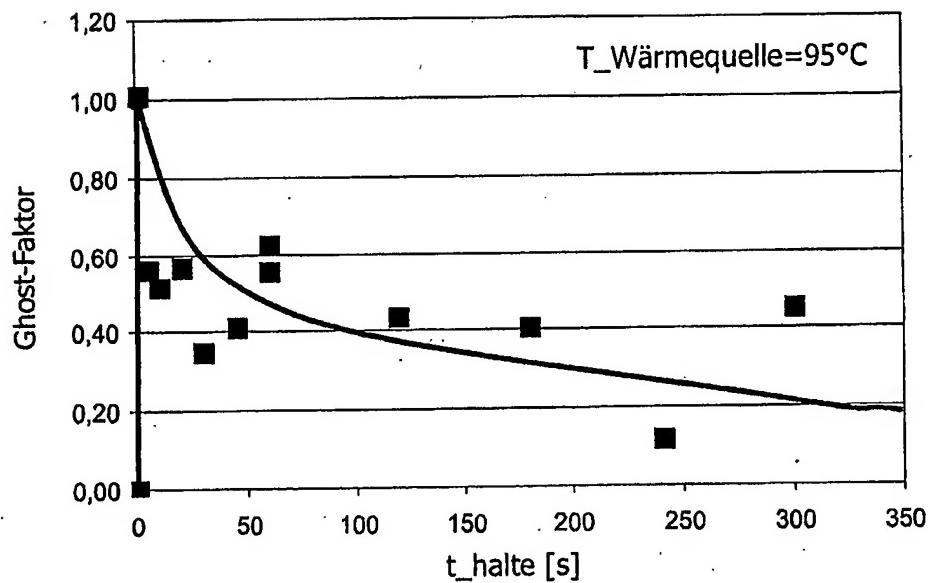
**Figur 3**

4/10

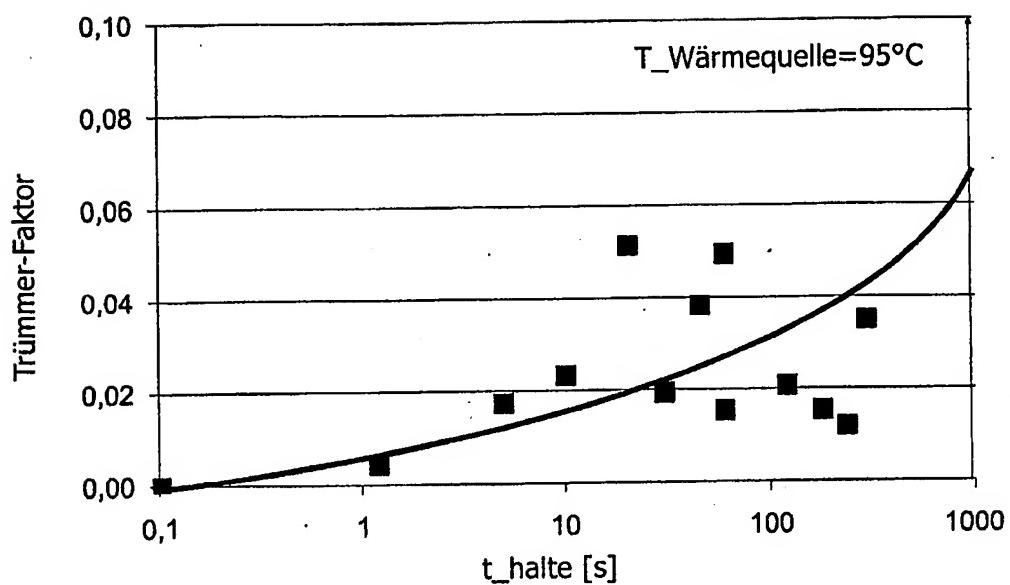


Figur 4

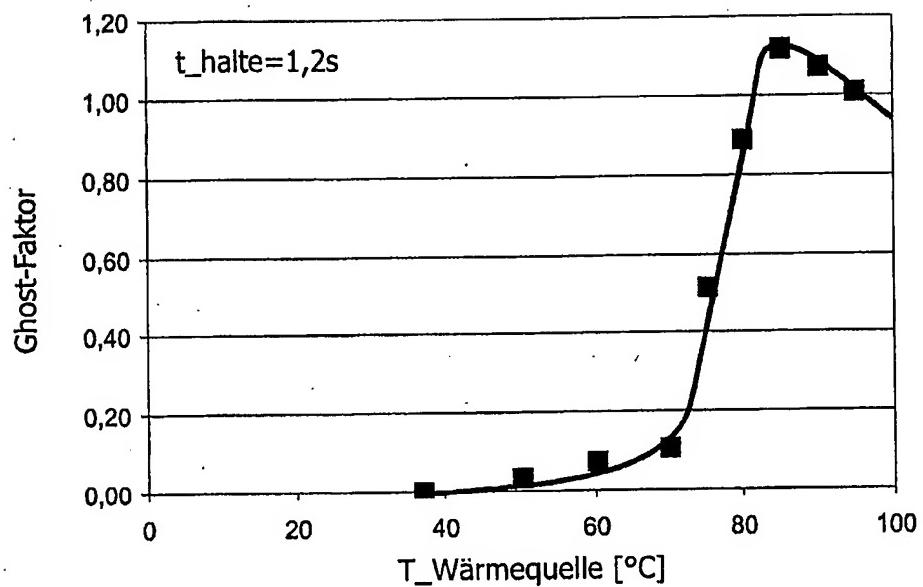
5/10

**Figur 5**

6/10

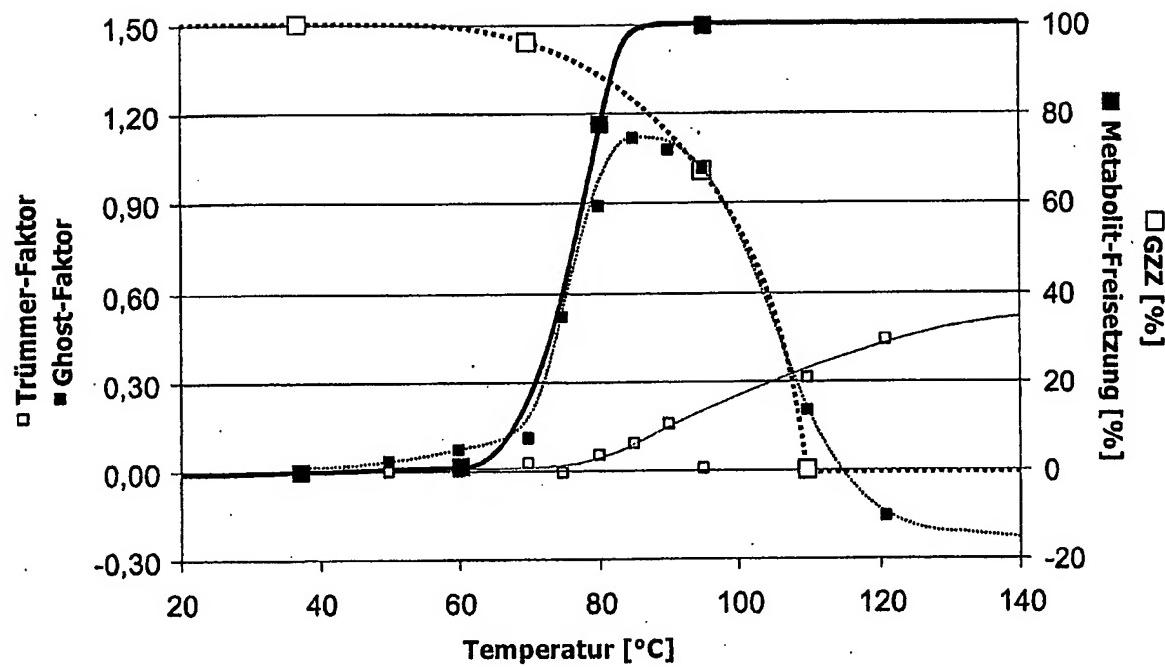
**Figur 6**

7/10



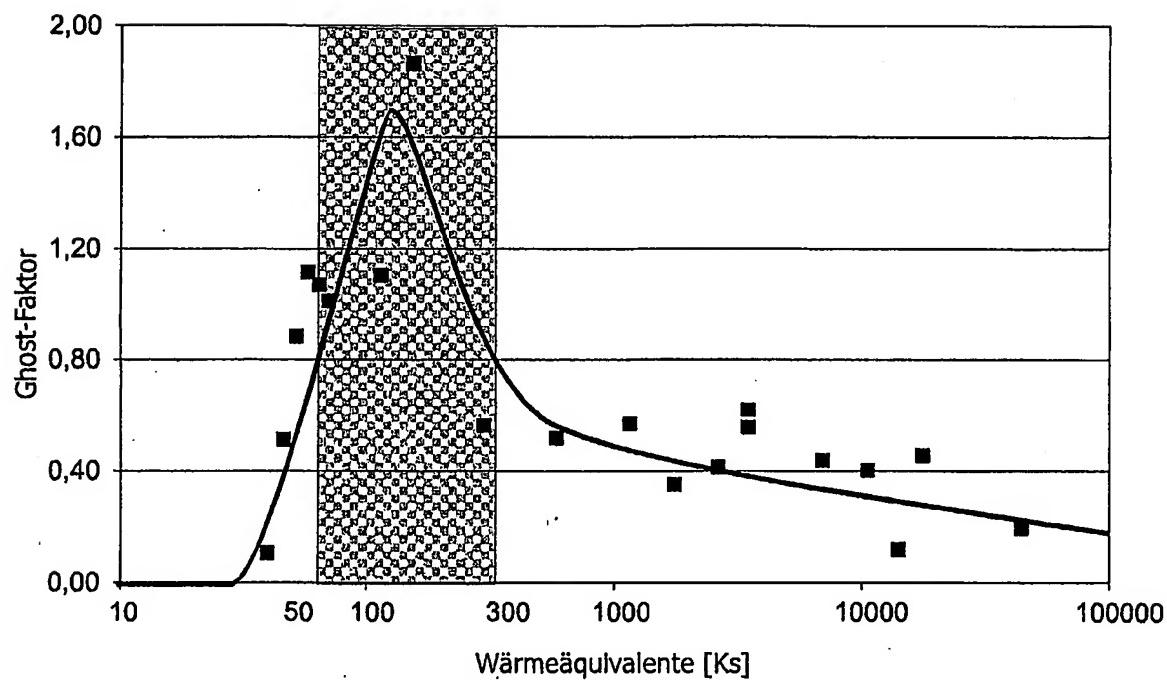
Figur 7

8/10

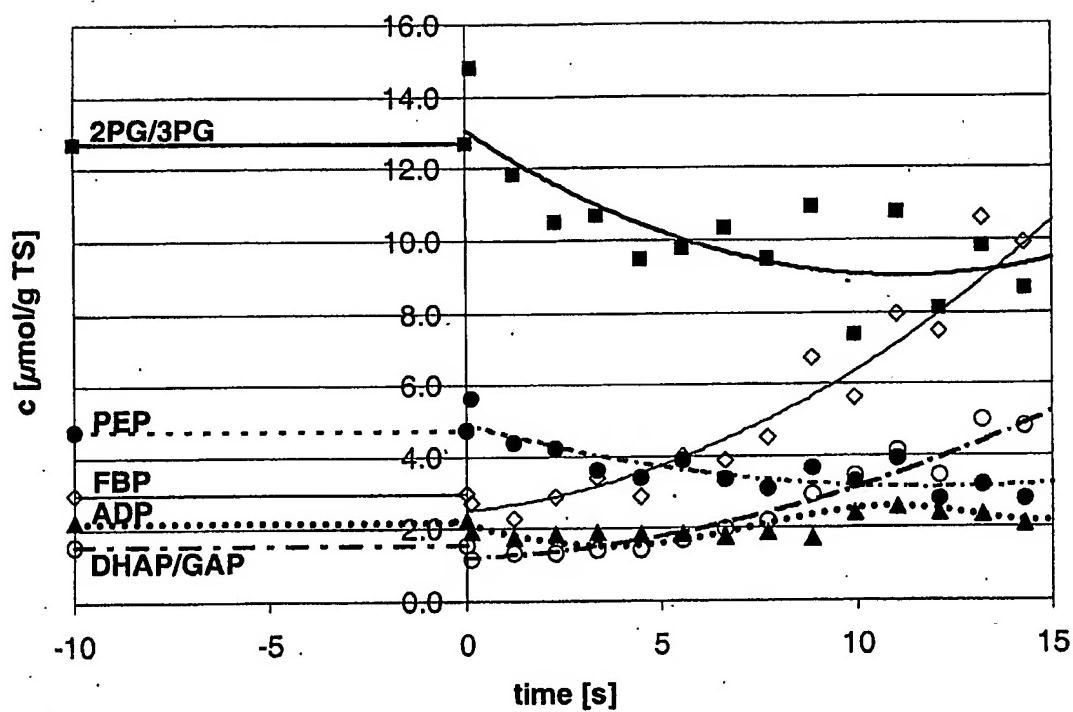


Figur 8

9/10

**Figur 9**

10/10



Figur 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/002065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C12N1/06 C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | US 6 197 553 B1 (LEE ANN L ET AL) 6 March 2001 (2001-03-06) column 3, line 38 - line 53 column 5, line 10 - line 27; claim 1; figure 1; examples 1,2 | 1-21 |
| A | US 5 837 452 A (CLARK ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) column 6, line 24 - line 43 column 9, line 64 - line 66 column 15, line 56 - column 16, line 29; claim 1 | 1-21 |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

15 August 2005

Date of mailing of the International search report

22/08/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cubas Alcaraz, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/002065

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date | |
|--|------------------|---|--|--|--|
| US 6197553 | B1 06-03-2001 | US 2002001829 A1 AU 709003 B2 AU 5921996 A CA 2220867 A1 CN 1190435 A CZ 9703661 A3 EA 785 B1 EP 0827536 A1 HR 960222 A1 HU 9802557 A2 JP 11505707 T NO 975280 A NZ 309231 A PL 323475 A1 SK 155797 A3 WO 9636706 A1 AT 277175 T AU 708798 B2 AU 3126295 A CA 2192342 A1 DE 69533552 D1 EP 0771355 A1 ES 2227557 T3 JP 10503086 T WO 9602658 A1 | | | 03-01-2002 19-08-1999 29-11-1996 21-11-1996 12-08-1998 15-04-1998 24-04-2000 11-03-1998 31-12-1997 01-02-1999 25-05-1999 16-01-1998 28-10-1999 30-03-1998 08-07-1998 21-11-1996 15-10-2004 12-08-1999 16-02-1996 01-02-1996 28-10-2004 07-05-1997 01-04-2005 24-03-1998 01-02-1996 |
| US 5837452 | A 17-11-1998 | US 5786208 A AT 234352 T AU 693836 B2 AU 1183795 A CA 2176496 A1 DE 69432242 D1 DE 69432242 T2 DK 657530 T3 EP 0657530 A2 ES 2194022 T3 JP 9505479 T KR 230909 B1 WO 9514768 A2 | | 28-07-1998 15-03-2003 09-07-1998 13-06-1995 01-06-1995 17-04-2003 28-08-2003 10-06-2003 14-06-1995 16-11-2003 03-06-1997 01-12-1999 01-06-1995 | |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002065

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N1/06 C12N15/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der In Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | US 6 197 553 B1 (LEE ANN L ET AL) 6. März 2001 (2001-03-06) Spalte 3, Zeile 38 - Zeile 53 Spalte 5, Zeile 10 - Zeile 27; Anspruch 1; Abbildung 1; Beispiele 1,2 | 1-21 |
| A | US 5 837 452 A (CLARK ET AL) 17. November 1998 (1998-11-17) Spalte 6, Zeile 24 - Zeile 43 Spalte 9, Zeile 64 - Zeile 66 Spalte 15, Zeile 56 - Spalte 16, Zeile 29; Anspruch 1 | 1-21 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidieren, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

15. August 2005

22/08/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 6818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Cubas Alcaraz, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/002065

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung | |
|--|----|-------------------------------|---|--|--|
| US 6197553 | B1 | 06-03-2001 | US 2002001829 A1 AU 709003 B2 AU 5921996 A CA 2220867 A1 CN 1190435 A CZ 9703661 A3 EA 785 B1 EP 0827536 A1 HR 960222 A1 HU 9802557 A2 JP 11505707 T NO 975280 A NZ 309231 A PL 323475 A1 SK 155797 A3 WO 9636706 A1 AT 277175 T AU 708798 B2 AU 3126295 A CA 2192342 A1 DE 69533552 D1 EP 0771355 A1 ES 2227557 T3 JP 10503086 T WO 9602658 A1 | | 03-01-2002 19-08-1999 29-11-1996 21-11-1996 12-08-1998 15-04-1998 24-04-2000 11-03-1998 31-12-1997 01-02-1999 25-05-1999 16-01-1998 28-10-1999 30-03-1998 08-07-1998 21-11-1996 15-10-2004 12-08-1999 16-02-1996 01-02-1996 28-10-2004 07-05-1997 01-04-2005 24-03-1998 01-02-1996 |
| US 5837452 | A | 17-11-1998 | US 5786208 A AT 234352 T AU 693836 B2 AU 1183795 A CA 2176496 A1 DE 69432242 D1 DE 69432242 T2 DK 657530 T3 EP 0657530 A2 ES 2194022 T3 JP 9505479 T KR 230909 B1 WO 9514768 A2 | 28-07-1998 15-03-2003 09-07-1998 13-06-1995 01-06-1995 17-04-2003 28-08-2003 10-06-2003 14-06-1995 16-11-2003 03-06-1997 01-12-1999 01-06-1995 | |